

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**A levedura como sistema modelo no estudo de compostos
químicos: Caso de estudo da fibrose quística**

Inês Coitos da Silva

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Lisete Celestina Perpétua Fernandes
Carlos Miguel Farinha

2020



BioISI
Biosystems and Integrative
Sciences Institute

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no M&B – Microbiology & Biotechnology do BioISI – Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa sob a orientação direta da Prof. Doutora Lisete Fernandes.

O Prof. Doutor Carlos Farinha foi o orientador interno designado no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento (UID/MULTI/04046/2019) do centro de I&D, BioISI, no qual este trabalho foi desenvolvido.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo financiamento do projecto Yeast&CF_IDI&CA2018, no qual este trabalho está inserido.

Em primeiro lugar, agradeço à Prof. Doutora Lisete Fernandes pela oportunidade de integrar o seu grupo de investigação e realizar este trabalho. Pela supervisão científica, incentivo ao pensamento crítico e paciência demonstrada.

Ao Prof. Doutor Carlos Farinha por ter aceite ser o orientador interno nesta tese e pela revisão da mesma.

Aos colegas do Mestrado e do laboratório do Tec Labs agradeço o companheirismo, a ajuda e a amizade.

Agradeço à técnica coordenadora Ana Marques, e aos meus colegas do serviço de Anatomia Patológica do Hospital CUF Descobertas, pela compreensão e apoio e por me acompanharem nesta etapa.

À minha família e aos meus pais, por acreditarem que o conhecimento é imprescindível e por me apoiarem incondicionalmente. Um agradecimento especial à minha prima Alexandra que será sempre o meu exemplo.

Ao Bruno, a pessoa mais focada, trabalhadora e exigente que conheço, agradeço a paciência e o apoio.

Resumo

A Fibrose Quística é uma doença autossômica recessiva causada por mutações que resultam na redução da atividade ou expressão da proteína *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* na superfície das células. Desde a última década tem-se constatado avanços significativos na terapêutica farmacológica desta doença multissistêmica, particularmente na utilização de pequenas moléculas que atuam diretamente na proteína CFTR, fisiopatologicamente responsável pela doença. O mecanismo de ação destes fármacos é ainda discutido e não se encontra completamente descrito. Para além disso, a combinação de leveduras com os novos moduladores da Fibrose Quística não foi ainda documentada. Deste modo, esta investigação tem como principal objetivo avaliar o impacto dos fármacos tezacaftor (VX-661), ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809) na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, através da caracterização do citoesqueleto (actina-F e microtúbulos). O impacto destes fármacos foi testado numa estirpe selvagem (BY4742) e numa estirpe derivada isogénica. Relativamente à distribuição de microtúbulos, não foi identificado um efeito após exposição aos compostos, o que sugere a ausência de um impacto sobre o ciclo celular da levedura. Adicionalmente, constatámos um efeito na distribuição da actina-F nas células de uma colónia de estirpe selvagem expostas a VX-770 e VX-809, tendo-se observado despolarização de *patches* e cabos e uma redução do número de cabos no córtex celular. Estes resultados podem indicar uma resposta ao *stress* mediada pela actina-F, sendo necessárias experiências adicionais para testar esta hipótese. No que diz respeito ao efeito dos compostos sobre a estirpe isogénica, não foi possível obter resultados reprodutíveis devido ao pequeno número de colónias e à variabilidade de crescimento após a transformação.

Palavras-chave: Fibrose quística; VX; levedura; actina-F; microtúbulos.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive caused by mutations that lead to reduced activity or expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein at the cell surface. Small-molecule drugs targeting directly the faulty protein developed within the last decade have led to remarkable progress in the treatment of this multisystemic disease. However, the precise mechanism by which these drugs act is yet to be fully understood. Moreover, there are no studies reporting on the combinations of yeasts with CF drugs. Thus, we aimed to investigate the impact of the CF drugs tezacaftor (VX-661), ivacaftor (VX-770) and lumacaftor (VX-809) in a yeast model of *Saccharomyces cerevisiae*. To do so, we have assessed the impact of the CF drugs on cytoskeleton (F-actin and microtubules) in two strains – wild type (BY4742) and an isogenic strain to wild type. We found no effect on microtubules distribution after VX drug exposure, which suggest that these have no impact on the yeast cell cycle. On the other hand, we found that VX-770 and VX-809 had an effect on the F-actin distribution in one wild type colony, having observed depolarization of both patches and cables and a reduction in the number of cables in the cellular cortex. These findings may indicate a stress response mediated by F-actin, yet additional investigations are warranted to test this hypothesis. We could not determine the effect of VX drugs on the isogenic strain, as non-reproducible results were observed due to growth variability between colonies and the small number of colonies obtained after transformation.

Keywords: Cystic fibrosis; VX drugs; yeast; F-actin; microtubules.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FIBROSE QUÍSTICA.....	1
1.1.1 Terapêutica moduladora da FQ.....	2
1.2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE	3
1.2.1 Citoesqueleto	3
1.3 OBJETIVO.....	5
1.3.1 Objetivos específicos	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
2.1 ESTIRPES E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	6
2.2 CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES	6
2.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	7
2.3.1 Fixação celular, marcação da actina-F e marcação nuclear	7
2.3.2 Aquisição de imagem.....	7
2.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE CELULAR AOS MODULADORES VX.....	7
3. RESULTADOS.....	8
3.1 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	8
3.2 ESTIRPE SELVAGEM BY4742 (#406TUBGFP)	10
3.2.1 Análise dos procedimentos experimentais com menor quantidade de células sem α -tubulina visível.....	10
3.2.2 Análise dos procedimentos experimentais com maior quantidade de células sem α -tubulina visível	12
3.3 ESTIRPE DERIVADA ISOGÉNICA (#93TUBGFP).....	14
3.3.1 Os moduladores VX não influenciam a distribuição de α -tubulina durante o ciclo celular	16
4. DISCUSSÃO	21

4.1	A POPULAÇÃO CELULAR DE UMA DAS COLÓNIAS DA ESTIRPE SELVAGEM É SENSÍVEL AOS EFEITOS DE IVACAFTOR (VX-770) E LUMACAFTOR (VX-809).....	22
4.2	OS MODULADORES VX NÃO AFETAM O CICLO CELULAR	23
5.	CONCLUSÃO	24
6.	BIBLIOGRAFIA	25
7.	ANEXOS	31
7.1	ANEXO I.....	31
7.2	ANEXO II.....	32
7.3	ANEXO III	33
7.4	ANEXO IV	35

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura de CFTR.....	2
Figura 3.1 - Validação dos procedimentos experimentais.....	9
Figura 3.2 - Valor relativo da DO (I) e quantificação de actina polarizada e cabos (II) da estirpe selvagem de <i>S. cerevisiae</i> após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (B) da transformação 1. Colónia (E) e (F) da transformação 2. Colónia (G) da transformação 3.....	11
Figura 3.3 - Imagens representativas do citoesqueleto (actina-F e α -tubulina) da estirpe selvagem de <i>S. cerevisiae</i> , em células incubadas com DMSO, VX-661, VX-770 e VX-809 (10mM) durante 30 min. Colónia G da transformação 3.....	12
Figura 3.4 - Quantificação de actina polarizada e cabos, da estirpe selvagem de <i>S. cerevisiae</i> após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónias (C) e (D) da transformação 1.	13
Figura 3.5 - Valor relativo da DO (I) e quantificação de actina polarizada e cabos (II) da estirpe BY4742 de <i>S. cerevisiae</i> após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (A) da transformação 1.....	13
Figura 3.6 - Valor relativo da DO (I) e quantificação de actina polarizada e cabos (II) da estirpe BY4742 de <i>S. cerevisiae</i> após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (H) da transformação 4.....	14
Figura 3.7 - Imagens representativas do citoesqueleto (actina-F e α -tubulina) da estirpe isogénica a BY4742, em células incubadas com DMSO, VX-661, VX-770 e VX-809 (10mM) durante 30 min. Colónia (H), da transformação 4.....	15
Figura 3.8 - Valor relativo da DO (I) e quantificação de actina polarizada e cabos (II) da estirpe isogénica a BY4742 de <i>S. cerevisiae</i> após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónias (K) e (L) da transformação 5	16
Figura 3.9 - Esquema representativo da organização de α -tubulina, na estirpe selvagem, nas fases G1 e S do ciclo celular, e em células incubadas com o controlo (DMSO), VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (G), transformação 3.	18
Figura 3.10 - Esquema representativo da organização de α -tubulina, na estirpe selvagem, na fase G2 e metáfase do ciclo celular, e em células incubadas com o controlo (DMSO), VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (G), transformação 3.....	19
Figura 3.11 - Esquema representativo da organização de α -tubulina, na estirpe selvagem, nas anafase e telofase do ciclo celular, e em células incubadas com o controlo (DMSO), VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (G), transformação 3.....	20
Figura 4.1 - Esquema representativo da distribuição de estruturas de actina-F (<i>patches</i> e cabos) em células incubadas com tezacaftor (VX-661), ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809), na estirpe selvagem.....	22

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 - Percentagem de células sem α -tubulina.....	9
Tabela 3.2 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com maior quantidade de tubulina visível.....	17
Tabela 3.3 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com maior quantidade de tubulina visível.....	17
Tabela 3.4 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com maior quantidade de tubulina visível.....	17
Tabela 7.1 - Data dos procedimentos experimentais da estirpe selvagem BY4742 (#406).	31
Tabela 7.2 - Data dos procedimentos experimentais da estirpe isogénica a BY4742 (#93).....	31
Tabela 7.3 - Intervalo de tempo entre os diferentes procedimentos experimentais da estirpe selvagem BY4742 (#406).....	32
Tabela 7.4 - Intervalo de tempo entre os diferentes procedimentos experimentais da estirpe isogénica a BY4742 (#93).....	32
Tabela 7.5 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes das colónias A e B da transformação 1.	33
Tabela 7.6 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes das colónias C e D da transformação 1.....	33
Tabela 7.7 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes das colónias E e F da transformação 2.	33
Tabela 7.8 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes da colónia G da transformação 3.	34
Tabela 7.9 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes da colónia H da transformação 4	34
Tabela 7.10 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes das colónias K e L da transformação 5.....	34
Tabela 7.11 – Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com menor quantidade de tubulina visível. Colónias (A), (C) e (D) da transformação 1.	35
Tabela 7.12 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com menor quantidade de tubulina visível. Colónia (H) da transformação 4.	35
Tabela 7.13 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com menor quantidade de tubulina visível. Colónias (K) e (L) da transformação 5.	36

Lista de Abreviaturas

ABC	do inglês <u>A</u> TP - <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ADN	ácido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico
ASR	do inglês <u>a</u> ctin <u>s</u> tress <u>r</u> esponse
CAA	do inglês <u>c</u> asamino <u>a</u> cids
CFTR	do inglês <u>c</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransmembrane conductance <u>r</u> egulator
DAPI	do inglês 4',6- <u>d</u> iamidino-2-phenylindole
DIC	do inglês <u>d</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> ontrast microscopy
DO	<u>d</u> ensidade <u>ó</u> ptica
DMSO	<u>d</u> imetil <u>s</u> ulfóxido
ENaC	do inglês <u>e</u> pithelial <u>s</u> odium <u>c</u> hannel
ERAD	do inglês <u>e</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum- <u>a</u> ssociated <u>d</u> egradation
FEV	do inglês <u>f</u> orced <u>e</u> xpiratory <u>v</u> olume
FQ	fibrose quística
GFP	do inglês <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
i.e.	do latim <i>id est</i> (isto é)
MAT	do inglês <u>m</u> ating <u>t</u> ype
MSD	do inglês <u>m</u> embrane <u>s</u> panning <u>d</u> omain
NBD	do inglês <u>n</u> ucleotide <u>b</u> inding <u>d</u> omain
ODCase	<u>o</u> rotidina 5'-fosfatase <u>d</u> ecarboxilase
PKA	do inglês <u>p</u> rotein <u>k</u> inase <u>A</u>
RE	retículo endoplasmático
SPB	do inglês <u>s</u> pindle <u>p</u> ole <u>b</u> ody
SC	sintético e completo
TRITC	do inglês <u>t</u> etramethyl <u>r</u> hodamine <u>i</u> sothi <u>c</u> yanate
YPD	do inglês <u>y</u> east <u>e</u> xtract <u>p</u> eptone <u>d</u> extrose agar

1. Introdução

1.1 Fibrose Quística

A Fibrose Quística (FQ) é uma doença hereditária rara que se transmite de forma autossômica recessiva, e é maioritariamente diagnosticada em indivíduos caucasianos¹. Fisiopatologicamente, é causada por mutações no gene que codifica a proteína reguladora da condutância transmembranar da Fibrose Quística (*Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator* - CFTR)²⁻⁴, a qual se encontra na membrana apical de vários tecidos epiteliais exócrinos^{5,6}.

Globalmente, a FQ afeta aproximadamente 70000 pessoas⁷, das quais cerca de 48000 na Europa⁸. Atualmente, pelos avanços significativos na gestão terapêutica⁹ destes doentes, tem-se verificado um aumento da sobrevida, para uma média de 44 anos nos EUA¹⁰ e 31 anos na Europa⁸.

A CFTR faz parte da superfamília de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC)¹¹⁻¹³ e funciona como canal aniónico para o cloreto e bicarbonato nas células epiteliais. Através da hidrólise de ATP é controla a abertura e fecho do canal CFTR sendo potenciado o transporte de cloreto e bicarbonato^{11,12}.

A proteína CFTR é um transportador com 1480 resíduos de aminoácidos³, constituída por dois domínios transmembranares (*membrane spanning domain* - MSD1 e MSD2) que formam o canal aniónico - ambos contêm 6 hélices transmembranares (M1-6), dois domínios intracelulares de ligação a nucleótidos (*nucleotide binding domain* - NBD1 e NBD2), que hidrolisam o ATP em ADP. A ativação da CFTR ocorre pela fosforilação do domínio R¹⁴ pela proteína cinase A (*protein kinase A* - PKA) dependente do cAMP^{11,12,14,15} (Figura 1.1).

A CFTR é sintetizada a nível do retículo endoplasmático (RE), onde é submetida a um extenso controlo de qualidade¹⁶. Posteriormente, desloca-se para o complexo de Golgi, onde é processada, sendo depois transportada para a superfície da membrana plasmática^{17,18}.

Uma das principais funções da CFTR é manter a homeostase iónica e aquosa em diferentes tecidos, em conjunto com o canal epitelial de sódio (*epithelial sodium channel* - ENaC)^{19,20}. O desequilíbrio osmótico causado pela redução do transporte de cloreto e pela reabsorção de sódio pela ENaC¹⁹ resulta no compromisso da normal eliminação de muco e no aumento do pH pela diminuição da secreção de bicarbonato^{15,21}.

A desidratação das secreções e subsequente aumento da viscosidade do muco promove a obstrução crónica das vias aéreas, insuficiência pancreática e consequente mal absorção intestinal⁹. Embora muitos órgãos sejam afetados pela FQ o sistema respiratório é o mais frequentemente envolvido e constituiu a principal causa de morbilidade e mortalidade^{22,23}.

Atualmente estão descritas mais de 2000 variantes no gene CFTR²⁴ que se prevê causarem FQ, em paralelo com uma elevada variabilidade fenotípica observada em doentes com o mesmo genótipo^{9,25}.

A mutação mais comum da FQ¹ (a primeira mutação identificada^{2,3}), origina a supressão de três pares de bases que codificam a fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR. A F508del está presente em 81% dos doentes na Europa⁸ e 85% nos EUA¹⁰ e resulta na proteólise da CFTR imatura e na diminuição desta proteína na membrana citoplasmática¹⁸.

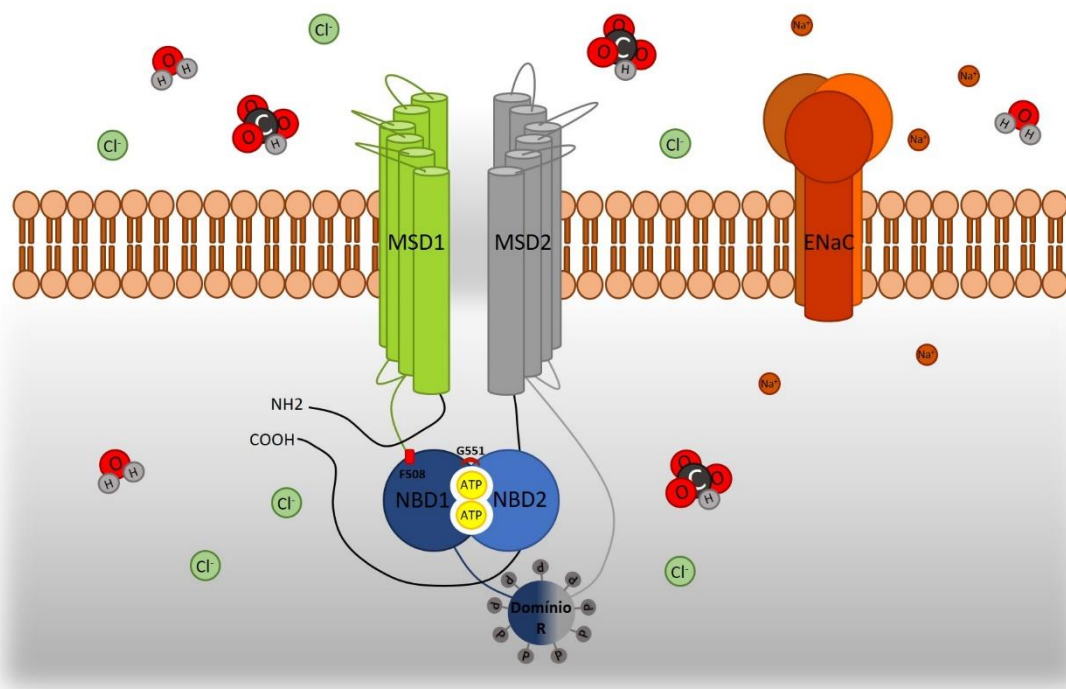


Figura 1.1 - Estrutura de CFTR. Como membro da superfamília ABC, CFTR é constituído por dois domínios transmembranares (MSD1 e MSD2), dois domínios intracelulares de ligação a nucleótidos NBD1 e NBD2, que hidrolisam o ATP em ADP, e um domínio regulador R. O canal abre quando o domínio R é fosforilado pela proteína cinase A (PKA) e quando o ATP é hidrolisado pelos NBDs. A CFTR transporta cloreto e bicarbonato^{11,12} e em conjunto com o canal epitelial de sódio (ENaC)^{19,20} mantém a homeostase iônica e aquosa em diferentes tecidos. F508 (a vermelho) está localizado entre a ligação de NBD1 e um *loop* citoplasmático de MSD1. G551 (a vermelho) está localizado entre NBD1 e NBD2. (Adaptado de 25,26,136–139).

Este aminoácido medeia uma interação entre o domínio NBD1 e um *loop* citoplasmático do domínio MSD1, e a sua deleção impede a formação da estrutura terciária da proteína CFTR. Por conseguinte, a alteração na conformação de CFTR²⁶ induz a retenção desta proteína no RE onde é rapidamente degradada pela degradação associada ao retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum-associated degradation* - ERAD)^{15,16,27}.

Outros defeitos genéticos incluem mutações *missense* tais como a substituição da glicina pelo ácido aspártico na posição 551 do CFTR. Esta substituição ocorre no NBD1, num local de interface com o NBD2, e resulta no tráfego de G551D CFTR para a superfície da célula apical com reduzida probabilidade de abertura do canal (P_0). Esta diminuição conduz a uma incapacidade de transporte de cloreto na presença de ATP^{18,28}.

1.1.1 Terapêutica moduladora da FQ

O tratamento dos doentes com FQ requer uma abordagem multidisciplinar^{9,23}. Avanços significativos na terapêutica farmacológica possibilitaram a descoberta de novos fármacos moduladores que têm como alvo a mutação da proteína CFTR. Estas moléculas são categorizadas nos seguintes: (1) corretores, os quais atuam como *chaperones* que facilitam o tráfego da CFTR mutada para a membrana citoplasmática, ou (2) potenciadores, os quais potenciam a atividade do canal de cloreto CFTR mutante dependente do cAMP na membrana plasmática¹⁸.

Os indivíduos com a mutação G551D foram os primeiros a beneficiar de terapêutica com moduladores²⁹. O potenciador ivacaftor (VX-770) promove a abertura de G551D CFTR¹⁸, aumentando a probabilidade de abertura (P_0) e o transporte de cloreto³⁰. O efeito do ivacaftor^{29,31} traduz-se na facilitação de um processo fisiológico normal, mitigando a probabilidade de doença pulmonar obstrutiva

do pulmão³⁰, o que consequentemente, tem demonstrado uma redução significativa do número da hospitalização em doentes com FQ³². Contudo, este modulador não é eficaz na maioria dos doentes com FQ²⁹.

O lumacaftor (VX-809) é um fármaco corretor que evita a degradação precoce de F508del CFTR promovendo o seu transporte para a superfície celular³³. Este corretor corrige a destabilização da interface NBD1:ICL4 causada pela eliminação de F508^{34,35}. Tal como o lumacaftor, o tezacaftor (VX-661) aumenta o transporte de cloreto em células epiteliais com a mutação F508del³⁶. No entanto, os ensaios clínicos têm demonstrado uma eficácia limitada^{29,37,38}, em paralelo com efeitos adversos respiratórios associados a esta terapêutica²⁹.

Atualmente, a melhor estratégia terapêutica para a correção de F508del CFTR envolve a combinação de dois ou três moduladores, uma vez que esta demonstrou aumentar o volume expiratório máximo em 1 segundo (*forced expiratory volume* - FEV₁), nomeadamente em estudos com tezacaftor-ivacaftor³⁶, e lumacaftor-ivacaftor²⁹ e elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor³⁹⁻⁴¹ assim como o aumento no transporte de cloreto³⁶.

Contudo, é fundamental reconhecer o mecanismo de ação destes compostos, assim como o seu potencial efeito nas células e eventual sinergismo, que não estão claramente descritos^{33,34,36}.

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariótico, unicelular cujo genoma foi o primeiro a ser sequenciado⁴². Este organismo é reconhecido como modelo eucariota devido à ortologia entre genes de eucariotas superiores e à elevada conservação de mecanismos metabólicos⁴³⁻⁴⁵. Por este motivo, e pelo facto de ter um genoma de pequenas dimensões (cerca de 12000 kb)⁴², *S. cerevisiae* impulsionou a investigação de diversas áreas como o envelhecimento⁴⁶⁻⁴⁸, a divisão celular⁴⁹⁻⁵¹ ou a resposta celular ao *stress*⁵²⁻⁵⁴.

Uma das vantagens de utilização de *S. cerevisiae* é a capacidade de eliminação completa de um gene de interesse e a sua substituição por um gene marcador auxotrófico^{55,56}. Neste contexto, após a transformação é possível selecionar os transformantes que contêm o plasmídeo desejado com o marcador nutricional necessário ao crescimento da levedura^{57,58}.

A evolução das metodologias genómicas e a utilização de mutantes com genes deletados possibilitou a identificação da função de diversas proteínas, os seus mecanismos de ação e respetivas vias metabólicas⁴⁴. Atualmente, *S. cerevisiae* é igualmente reconhecida no desenvolvimento de fármacos e no rastreio da sua sensibilidade e resistência⁵⁹.

Algumas das propriedades da levedura são particularmente adequadas aos estudos biológicos e incluem o crescimento rápido, com tempos de geração entre os 90 e os 140 min⁶⁰, a capacidade de sobreviver em diferentes condições⁶¹, e em meios completamente definidos, possibilitando a modulação da sua resposta fisiológica^{62,63}.

Por último, a levedura pode existir de forma estável em estados haploides ou diploides⁶⁴. A utilização de estirpes haploides mutantes permite identificar mutações recessivas, i.e., determinar a função de determinado gene, por exemplo, na resposta ao *stress* celular^{44,65}.

1.2.1 Citoesqueleto

O citoesqueleto consiste numa rede complexa e dinâmica de filamentos (estruturas proteicas formadas por várias subunidades associadas entre si por ligações não-covalentes) controlados por proteínas acessórias que determinam a sua distribuição e reorganização no citoplasma através de sinais intracelulares e extracelulares⁶⁶⁻⁶⁹. De modo geral, o citoesqueleto está envolvido no tráfego intracelular de organelos, intervém no ciclo celular, determina e mantém a forma e a integridade celular.

O citoesqueleto divide-se em microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermédios e são constituídos por diferentes unidades estruturais. Com exceção dos últimos, verifica-se uma elevada conservação das unidades estruturais entre leveduras e eucariotas superiores^{51,69,70}. Por este motivo, e pelo facto de existir uma estreita correlação temporal entre a progressão do ciclo celular e as alterações morfológicas, *S. cerevisiae* é utilizada como modelo no estudo do ciclo celular⁵⁰.

Adicionalmente, a divisão assimétrica neste organismo permite compreender o controlo da polaridade celular noutros organismos^{50,51}. De facto, esta é uma característica particularmente importante e transversal entre *S. cerevisiae* e eucariotas superiores, e que deve ser mantida em células diferenciadas⁶⁶. Células epiteliais polarizadas, como os enterócitos⁷¹, por exemplo, utilizam a rede organizada de filamentos para a manutenção funcional entre a superfície apical e basal.

A polarização em *S. cerevisiae* condiciona o crescimento da gémula a partir de um único local. A organização polarizada dos microfilamentos direciona a síntese de novas proteínas para o local da gemulação^{66,72} e a orientação do fuso mitótico^{49,73}.

Os microfilamentos ou filamentos de actina são polímeros longos e flexíveis, constituídos pelas subunidades de actina globular (actina-G)⁶⁹, sintetizados a partir de um único gene, ACT1^{74,75}. O filamento de actina é constituído por dois protofilamentos paralelos que se entrelaçam entre si. A actina existe em equilíbrio dinâmico entre dois estados, monómero (actina-G) e polímero filamentoso (actina-F). A montagem de monómeros de actina num filamento envolve uma etapa inicial de nucleação⁶⁹.

Os filamentos de actina estão dispersos por toda a célula, concentrados sobretudo no córtex, abaixo da membrana plasmática⁶⁹. Os microfilamentos intervêm em diversas funções celulares, tais como transporte intracelular e secreção proteica⁵¹, através da ligação com proteínas acessórias^{69,76}, citocinese, regulação genética e polaridade^{51,66}. Desempenham funções importantes como a osmorregulação⁷⁷ e a regulação do *stress* oxidativo da célula^{78,79}.

Em *S. cerevisiae* estão descritas estruturas dinâmicas e que integram a actina-F como os cabos e os *patches*⁸⁰. Os cabos são feixes de filamentos de actina, estão associados ao movimento de vesículas secretoras, RNAm, elementos do corpo polar de fuso e complexo de Golgi⁸¹. Estão descritos dois tipos de cabos, imóveis e móveis. Os cabos imóveis formados durante o ciclo celular estão associados à gémula e estendem-se a partir desta ao longo do eixo célula-mãe. Os cabos móveis são relativamente curtos e dispõem de uma orientação aleatória⁸².

Os *patches* são uma rede densa de filamentos ramificados de actina, altamente móveis^{83,84}, que em *S. cerevisiae* se associam em locais de secreção polarizada. Localizam-se nas extremidades dos cabos, orientando-os na membrana plasmática e estão intimamente associados aos endossomas^{72,81,85}. A distribuição e reorganização destas duas estruturas (cabos e *patches*) é alterada consoante a fase do ciclo celular^{51,69} e em resposta a estímulos externos^{77,86}. Segundo Karpova e colegas⁸⁵ e Adams e colegas⁸⁷, mutantes sem *patches* não são identificados. Por este motivo, foi formulada a hipótese de que os *patches* são essenciais para a viabilidade celular^{85,87}.

Os microtúbulos são polímeros cilíndricos rígidos e retos, constituídos por um heterodímero de α - e β -tubulina. O gene TUB2 codifica β -tubulina enquanto o gene TUB1 e TUB3 codificam α -tubulina⁸⁸. Os microtúbulos encontram-se organizados pelo corpo polar de fuso (*spindle pole body* - SPB)⁸⁸, e dividem-se em intranucleares e extranucleares, cuja distribuição e tamanho varia consoante o ciclo celular⁷³. Em leveduras, as funções dos microtúbulos estão limitadas a processos que envolvem o movimento dos cromossomas e do núcleo durante o ciclo celular^{89,90}.

1.3 Objetivo

Atualmente, os mecanismos de ação dos moduladores CFTR e os seus efeitos nas células não estão completamente estabelecidos. Conjuntamente, não existe descrição sobre a combinação de leveduras e os novos moduladores da FQ. *S. cerevisiae* é reconhecida no desenvolvimento de fármacos e no rastreio da sua sensibilidade e resistência⁵⁹. Adicionalmente, verifica-se uma elevada conservação entre mecanismos metabólicos e genes de eucariotas superiores⁴³⁻⁴⁵.

Por conseguinte, a utilização deste organismo como modelo de estudo permite esclarecer quais os efeitos biológicos comuns entre leveduras e eucariotas superiores dos que são restritos a leveduras.

Trabalhos anteriores (BioISI Project2017, Lisete Fernandes BioISI/FCUL, ESTeSL/IPL; Carlos M. Farinha BioISI/FCUL; Laurent Kuras I2BC, FR) levaram à identificação de uma resposta molecular dos moduladores em *S. cerevisiae*.

Este trabalho (integrado no projeto IPL/IDI&CA 2018/Yeast&CF_ESTeSL) tem como finalidade desenvolver uma investigação adicional de forma a clarificar os efeitos moleculares que podem ser comuns entre leveduras e mamíferos e os que são restritos a leveduras. Desta forma, pretendeu-se caracterizar dois filamentos do citoesqueleto (actina-F e microtúbulos) em *S. cerevisiae* com tezacaftor (VX-661), ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809).

1.3.1 Objetivos específicos

- a) Construção de estirpes de levedura TUB1-GFP a partir das estirpes ancestrais dos trabalhos anteriores (BioISI_Project2017).
- b) Visualização do citoesqueleto por microscopia de fluorescência após a exposição das células a tezacaftor (VX-661), ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809), nas condições previamente otimizadas em BioISI_Project2017.
 - A integridade dos microtúbulos será avaliada nas estirpes construídas em a);
 - A integridade de actina-F será avaliada simultaneamente com TUB1-GFP nas estirpes construídas em b).

2. Materiais e Métodos

2.1 Estirpes e condições de crescimento

Neste trabalho foram utilizadas duas estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* ancestrais às utilizadas no trabalho anterior (BioISI_Project2017), nomeadamente a estirpe selvagem (BY4742, Euroscarf) (#406) com o genótipo *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*⁹¹, e uma estirpe derivada isogénica desta (#93).

Ambas as estirpes foram mantidas em stocks de glicerol a -80 °C⁹²⁻⁹⁴. Antes da sua utilização foram repicadas para uma placa de meio peptona-dextrose (*yeast extract peptone dextrose agar* - YPD) e incubadas durante 2 d a 28 °C. As células das estirpes #93 e #406 foram novamente repicadas para uma segunda placa de meio YPD durante 2 d a 28 °C^{92,95,96}.

2.2 Construção das estirpes

As estirpes selvagem (#406) e isogénica (#93) foram transformadas, pela integração da cassette TUB1-GFP_URA3, por recombinação homóloga, pelo método de acetato de lítio⁹⁷.

Inicialmente, foram inoculadas duas pré-culturas⁹⁸ em meio YPD líquido com células das estirpes #406 e #93 e incubadas a 180 rpm a 28 °C, durante aproximadamente 18 h até a DO_{600nm} atingir um valor superior a 3⁶⁰. Partindo das pré-culturas, a cultura foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido com DO_{600nm} de 0.2, e incubada durante 5 a 6 h, 180 rpm a 28 °C.

O sedimento foi obtido após centrifugação de 4,5 mL de cultura, e ressuspensionado em água destilada esterilizada. Após a segunda centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado com 200 µl LiAc/TE⁹⁹⁻¹⁰¹ (LiAc 0.1M; Tris-HCl 0.1mM pH 8; Na₂EDTA 1mM pH 8). A 50 µl foram adicionados 3 µl de DNA transformante^{98,101}, 4 µl de DNA *carrier mix*^{97,99,101} [DNA, esperma de salmão (5mg/mL)] e 300 µl de LiAc/PEG^{100,102} [40% (m/v) PEG 3350; Na₂EDTA 1mM pH 8; Tris-HCl 10mM pH 8; LiAc 0.1M], a 28 °C, com agitação orbital durante 30 min. As células foram incubadas durante 20 min a 42 °C e durante 30 min a 4 °C^{101,103,104}.

Após a incubação, as células foram recolhidas por centrifugação e o sedimento ressuspensionado em 300 µl de água destilada e esterilizada. Cada 100 µl foi espalhado em meio ácido casamino (*casamino acids* - CAA) sólido e seletivo sem uracilo (URA). A incubação ocorreu a 28 °C durante 4 a 5 d.

A cassette TUB1-GFP_URA3 contém um marcador seletivo, o gene URA3. O gene URA3 codifica a enzima orotidina 5'-fosfatase decarboxilase (ODCase) que catalisa uma reação na síntese de pirimidina. A presença do gene URA3 restaura a atividade de ODCase promovendo o crescimento das células em meio seletivo sem uracilo¹⁰⁵.

As colónias dos transformantes com crescimento visível foram repicadas numa placa de meio sólido e seletivo CAA-URA e incubadas a 28 °C durante 4 a 5 d. As células foram repicadas em placas de meio YPD e incubadas a 28 °C durante 2 d.

A pré-cultura líquida de meio sintético e completo (SC) foi inoculada com células da placa de meio YPD e incubada a 28 °C e 180 rpm, durante pelo menos 18 h. Partindo da pré-cultura, a cultura foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido com DO_{600nm} de 0.2, e incubada durante 5 a 6 h, 180 rpm a 28 °C.

O sedimento foi recolhido a partir de 1 mL de cultura após centrifugação e ressuspensionado com 50 µl PBSmic. A confirmação dos transformantes TUB1-GFP foi realizada por microscopia fluorescência.

2.3 Microscopia de fluorescência

A pré-cultura líquida de SC foi inoculada a partir da placa de meio YPD e incubada a 180 rpm a 28 °C, durante 18 h e até a $DO_{600\text{ nm}}$ atingir 3. A cultura foi iniciada com $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.2, e incubada com 28 °C, 180 rpm, durante 5 a 7 h. Após atingir $DO_{600\text{ nm}} \approx 0,7$ ¹⁰⁶ a cultura foi subdividida em cinco grupos e adicionados 5 µl (10 mM) de Tezacaftor (VX-661) (S7059, Selleck Chemicals), Ivacaftor (VX-770) (S1144, Selleck Chemicals), Lumacaftor (VX-809) (S1565, Selleck Chemicals) e dimetilsulfóxido (DMSO) (#STBH 9942, SIGMA)¹⁰⁷. As culturas foram incubadas a 28 °C, 150 rpm.

2.3.1 Fixação celular, marcação da actina-F e marcação nuclear

Após 30 min de incubação foi retirado da cultura uma alíquota de 1 mL e adicionado formaldeído (Merck, ref.: K40308703 931)^{108–110} a uma concentração final de 3,7%. Após 10 min de incubação a 28 °C com agitação orbital, o sedimento foi recolhido por centrifugação (13000 rpm, 20 °C) e ressuspensionado em 900 µL de PBS (130 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$) e 100 µL de formaldeído a uma concentração final de 3,7%.

Após 60 min de incubação com agitação orbital o sedimento foi centrifugado e as células foram lavadas três vezes com 500 µL de PBS. O sedimento foi ressuspensionado em 50 µL PBS, e incubado com 2 µL de isotiocianato de tetrametilrodamina (*tetramethylrhodamine isothiocyanate* - TRITC) conjugada com faloidina (76.6 µM) (P1951, Sigma-Aldrich)⁷⁶, durante 60 min, 28 °C, com agitação orbital.

O sedimento foi lavado três vezes com 100 µL de PBS e ressuspensionado com 3 µL de PBS, 1 µL de dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI) (5 µg/µL in PBS) (D9542, Sigma-Aldrich) e 5 µL de DABCO em glicerol a uma concentração final de 80% (DABCO: D2708, Sigma-Aldrich) (Glicerol: Nzytech, ref.: MB16101), dos quais 3 µL foram utilizados para preparar as amostras para observação ao microscópio. As lâminas foram seladas com lamela e verniz.

2.3.2 Aquisição de imagem

As células foram visualizadas no microscópio Leica DM5500B (objetiva de 100× óleo), com a câmara EL600 e três filtros: A4 para DAPI, Y3 para CY3/TRITC e L5 para GFP/FITC. A aquisição de imagem foi realizada com o sistema LasAF versão 4.40 e processamento de imagem ImageJ 1.52a. Para cada painel, as imagens foram adquiridas com o mesmo tempo de exposição. As células cuja marcação da actina foi realizada no mesmo dia, foram fotografadas no mesmo dia.

2.4 Avaliação da sensibilidade celular aos moduladores VX

O efeito das VX-661, VX-770 e VX-809 na proliferação celular das estirpes #406 e #93 foi determinado a partir das curvas de crescimento (metodologia descrita no ponto 2.3). A densidade óptica $DO_{600\text{ nm}}$ foi obtida imediatamente antes da adição dos compostos às culturas, tempo 0 (em *mid log-phase* exponencial com $DO \approx 0,7$) e após 3 h e 24 h de exposição.

3. Resultados

3.1 Validação dos procedimentos experimentais

De forma a determinar a validade de cada experiência, foi analisado o intervalo de tempo entre os diferentes procedimentos experimentais e a quantidade de células sem α -tubulina visível.

O período máximo entre o descongelamento e a fixação foi cerca 30 dias e tem em conta o tempo do crescimento celular e a execução dos procedimentos experimentais durante o fim de semana. Foram realizadas quatro transformações, das quais apenas duas cumpriram o intervalo de tempo ótimo, desde a descongelação das células até à fixação, nomeadamente, as colónias **E** e **F** da transformação 2 (**Figura 3.1**).

Com este trabalho, pretendeu-se avaliar filamentos do citoesqueleto, sendo crucial analisar células com tubulina e actina-F identificáveis e em simultâneo, por microscopia de fluorescência. Por conseguinte, numa primeira análise foi contabilizada a quantidade células sem α -tubulina visível.

A **Tabela 3.1** evidencia dois grupos de colónias distintos, o primeiro com maior quantidade de células sem α -tubulina visível (entre 24% e 82%), e o segundo com menor quantidade de células sem α -tubulina visível (entre 1% e 20%).

A partir da transformação 1 obtiveram-se quatro colónias da estirpe selvagem com a integração da cassette TUB1-GFP_URA3, e nenhuma colónia da estirpe isogénica. A análise da variação dos valores normalizados da DO relativos ao DMSO de duas colónias (**C** e **D**) não foi possível, porque a primeira leitura da DO (obtida 3 h após a exposição das células aos compostos VX) foi realizada aos 30 min de exposição.

Na transformação 2 foram obtidas duas colónias da estirpe selvagem, e nenhuma colónia da estirpe isogénica.

A transformação de 23 de junho de 2019 foi a única na qual foram obtidas colónias das estirpes selvagem (transformação 3) e isogénica (transformação 5). No entanto, as mesmas células foram utilizadas na transformação anterior (2).

Na transformação 4 foi obtida apenas uma colónia da estirpe isogénica (**H**). O crescimento de apenas uma colónia e a ausência do crescimento de colónias da estirpe selvagem no meio seletivo CAA-URA pode comprometer a validação dos resultados obtidos. A análise do procedimento experimental da estirpe isogénica requer a comparação com a estirpe selvagem, que constitui o padrão das variações¹¹ obtidas da análise do citoesqueleto.

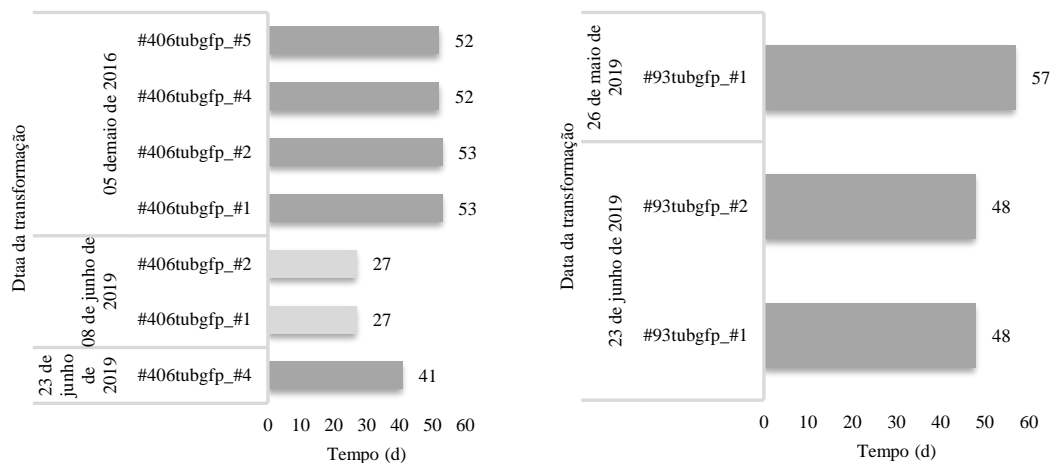


Figura 3.1 - Validação dos procedimentos experimentais. Período (d) entre a descongelação e o tratamento das células, da estirpe selvagem (#406TUBGFP) e da estirpe isogénica (#93TUBGFP).

Data da transformação	Identificação da transformação	Colónias	Identificação da Colónia	Não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809
05/05/2019	1	#406TUBGFP#1	A	73%	58%	60%	55%	54%
		#406TUBGFP#2	B	9%	6%	8%	8%	5%
		#406TUBGFP#4	C	55%	46%	75%	55%	56%
		#406TUBGFP#5	D	45%	46%	35%	24%	38%
08/06/2019	2	#406TUBGFP#1	E	2%	2%	3%	6%	5%
		#406TUBGFP#2	F	3%	4%	3%	3%	3%
23/06/2019	3	#406TUBGFP#4	G	2%	2%	1%	2%	1%
26/05/2019	4	#93TUBGFP#1	H	7%	4%	16%	8%	20%
23/06/2019	5	#93TUBGFP#1	K	75%	85%	80%	82%	80%
		#93TUBGFP#2	L	48%	42%	46%	45%	48%

Tabela 3.1 - Percentagem de células sem α -tubulina. A verde estão representadas as colónias com menor quantidade de células sem α -tubulina visível e a cinzento estão representadas as colónias com maior quantidade de células sem α -tubulina visível.

A sensibilidade das estirpes selvagem (#406TUBGFP) e da isogénica (#93TUBGFP) aos compostos foi analisada após exposição das culturas em *batch* com DMSO, VX-661 (Tezacaftor), VX-770 (Ivacaftor) e VX-809 (Lumacaftor), adicionadas durante a fase de crescimento exponencial.

3.2 Estirpe selvagem BY4742 (#406TUBGFP)

3.2.1 Análise dos procedimentos experimentais com menor quantidade de células sem α -tubulina visível

Após a identificação dos procedimentos experimentais com menor quantidade de células sem α -tubulina visível foi realizada uma segunda caracterização da actina-F, na qual, apenas as células com actina polimerizada e α -tubulina visível foram contabilizadas.

Numa primeira análise, não se identificou um padrão comum entre os valores da DO normalizados relativos ao DMSO nas colónias **B**, **E**, **F** e **G** (**Tabela 3.2**). A variação das curvas nas colónias **B**, **E** e **F** é muito subtil, com uma amplitude compreendida entre 1.04 às 3 h e 0.9 às 24 h (**Tabela 3.2 B – VX-809**). Na colónia **E**, às 3 h, na cultura incubada com VX-770 identifica-se um aumento relativo ao DMSO, no entanto, este valor é discrepante comparativamente com as colónias **B**, **C** e **E**, em que se verifica uma redução do valor da cultura correspondente.

Na avaliação da actina polarizada é identificada uma diminuição subtil nas culturas expostas à VX-661 e à VX-770, comparativamente com o DMSO. Nas culturas expostas à VX-809 esta variação é mais acentuada, com uma diminuição de actina polarizada relativamente ao DMSO que varia entre os 15% nas colónias **E** (41% - 26%), **C** (43% - 28%) e **G** (38% - 23%) e os 23% na colónia **B** (51% - 28%) (**Figura 3.2**).

Na avaliação da distribuição de cabos de actina identifica-se uma diminuição mais acentuada nas culturas expostas à VX-809, comparativamente com o DMSO (variando entre os 23% na colónia **B**, 10% na colónia **E**, 18% na colónia **F** e 19% na colónia **G**) (**Figura 3.3**). Nas culturas expostas à VX-661 esta variação é mais subtil, com exceção da colónia **G** em que se verifica um aumento de cabos de actina, comparativamente com o controlo (**Tabela 3.3**).

Os gráficos **E** e **F** representam colónias da transformação 2. As condições do procedimento experimental foram as mesmas, e por este motivo são consideradas réplicas biológicas. Desta forma, as diferenças identificadas devem ser mínimas e resultar de variações biológicas. No entanto, o mesmo não se verifica. A variação de cabos e de actina polarizada não é semelhante entre as colónias **E** e **F**.

A curva de crescimento da colónia **G** distingue-se das anteriores identificando-se uma variação uniforme nas culturas incubadas com VX-661, VX-770 e VX-809 às 3 h, seguida por um aumento na última leitura às 24 h. Em contrapartida, a curva da cultura sem tratamento corresponde a uma variação esperada, com valores semelhantes ao controlo (**Figura 3.2**).

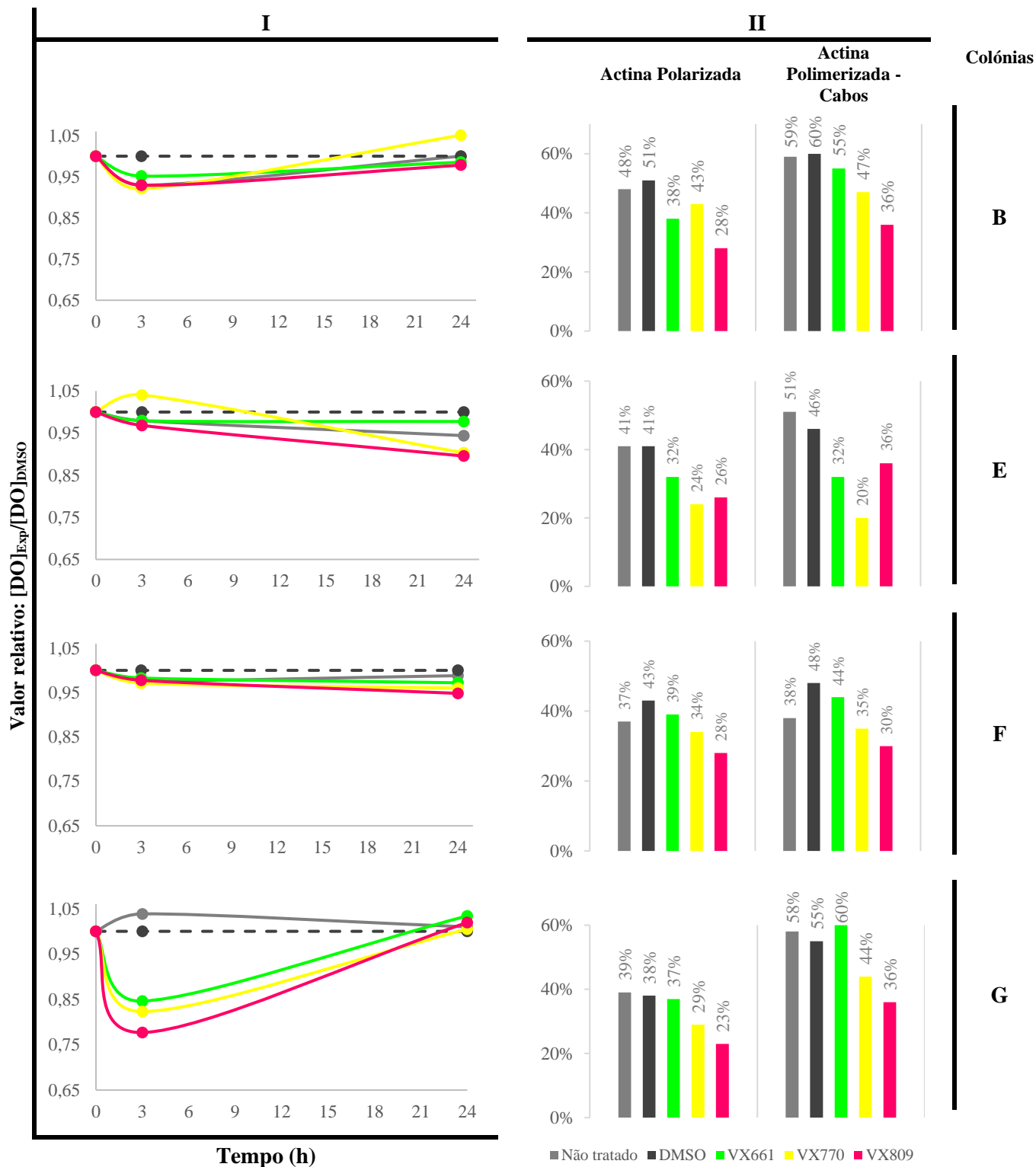


Figura 3.2 - Valor relativo da DO (I) e quantificação de actina polarizada e cabos (II) da estirpe selvagem de *S. cerevisiae* após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colônia (B) da transformação 1. Colônia (E) e (F) da transformação 2. Colônia (G) da transformação 3.

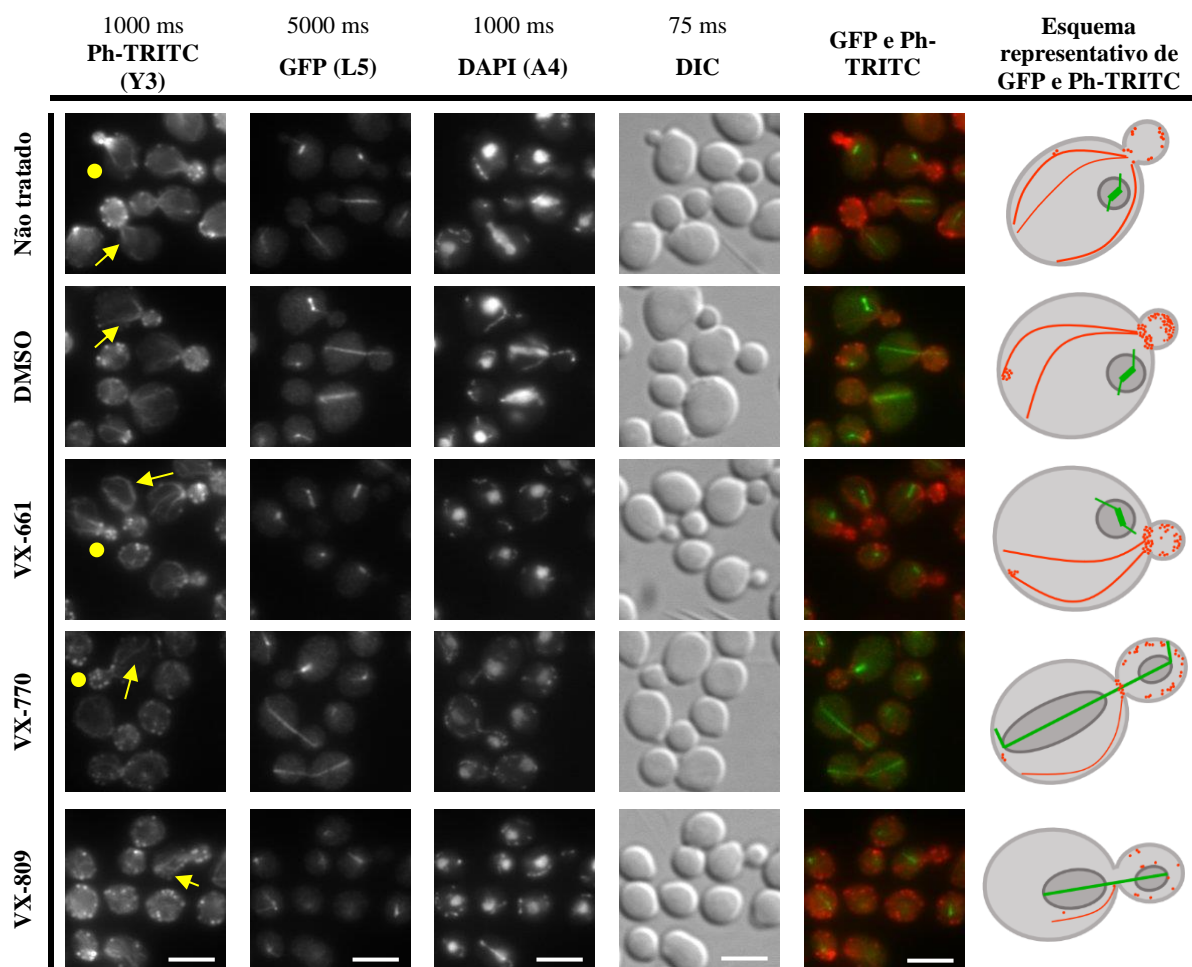


Figura 3.3 - Imagens representativas do citoesqueleto (actina-F e α -tubulina) da estirpe selvagem de *S. cerevisiae*, em células incubadas com DMSO, VX-661, VX-770 e VX-809 (10mM) durante 30 min. Colônia **G** da transformação 3. A primeira, segunda, terceira e quarta colunas correspondem, respectivamente, as imagens de microscopia de fluorescência de células a expressar actina-F marcada com TRITC conjugada com faloidina, α -tubulina, DNA nuclear e mitocondrial, e contraste de interferência diferencial. A quinta coluna corresponde à junção das imagens GFP (L5) e Ph-TRITC (Y3). A última coluna representa a distribuição de tubulina e actina-F. Seta: cabos, Bola: actina polarizada. Escala: 5 μ m

3.2.2 Análise dos procedimentos experimentais com maior quantidade de células sem α -tubulina visível

Foram identificadas quatro colônias com maior quantidade de células sem α -tubulina visível, o que condicionou a análise da actina polimerizada isoladamente. A ausência de células TUB3-GFP pode estar associada à reversão do processo de integração da cassete TUB1-GFP_URA3 durante a transformação, causada pela utilização de células velhas, com mais 30 d entre o descongelamento e a fixação. Este resultado impossibilita a análise conjunta de actina-F e microtúbulos, das quatro colônias acima referidas.

Numa primeira análise não se verificam semelhanças entre o padrão de distribuição de cabos e actina polarizada, entre as réplicas biológicas colônias **C** e **D**. Apesar de ser identificada uma diminuição do número de células com actina polarizada em ambas as colônias, a variação entre os valores da colônia **C**, nas culturas incubadas com VX-661, VX-770 e VX-809 é pouco significativa. A diferença maior entre as colônias é identificada na distribuição de cabos da cultura exposta a VX-661, com aumento visível na colônia **C** (65%), oposto à diminuição acentuada na colônia **D** (25%) (**Figura 3.4**). Em ambas as colônias, o gráfico referente ao valor relativo da DO não foi realizado.

Na colónia **A**, representada na **Figura 3.5** a diminuição do número de células com actina polarizada e cabos, nas culturas incubadas com VX-770 e VX-809 é visível. No entanto, o padrão da distribuição da actina polimerizada difere entre colónias na cultura incubada com VX-661.

Relativamente ao valor relativo da DO identifica-se uma diminuição muito subtil e pouco significativa nas colónias incubadas com VX-661 e VX-809 às 3 h e às 24 h, e um aumento do valor relativo às 3 h da VX-770.

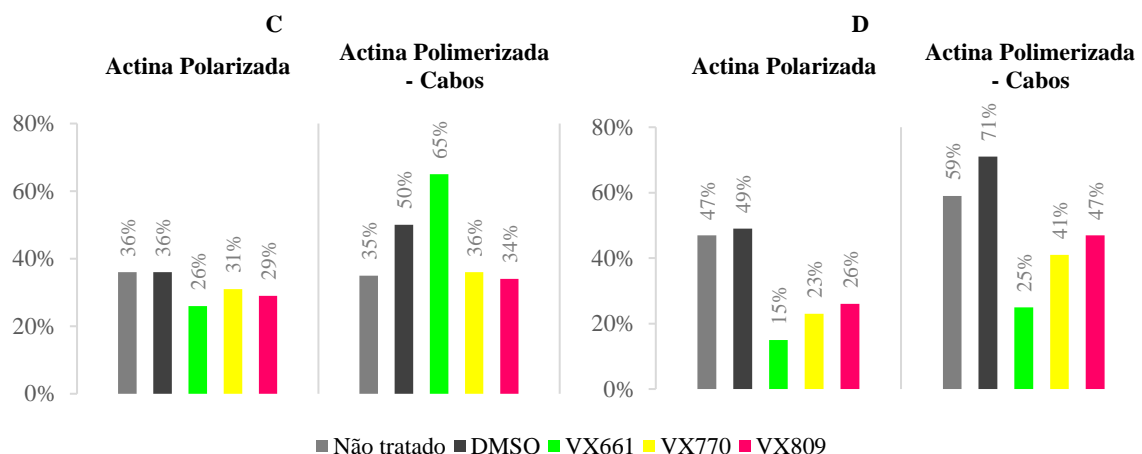


Figura 3.4 - Quantificação de actina polarizada e cabos, da estirpe selvagem de *S. cerevisiae* após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónias (**C**) e (**D**) da transformação 1.

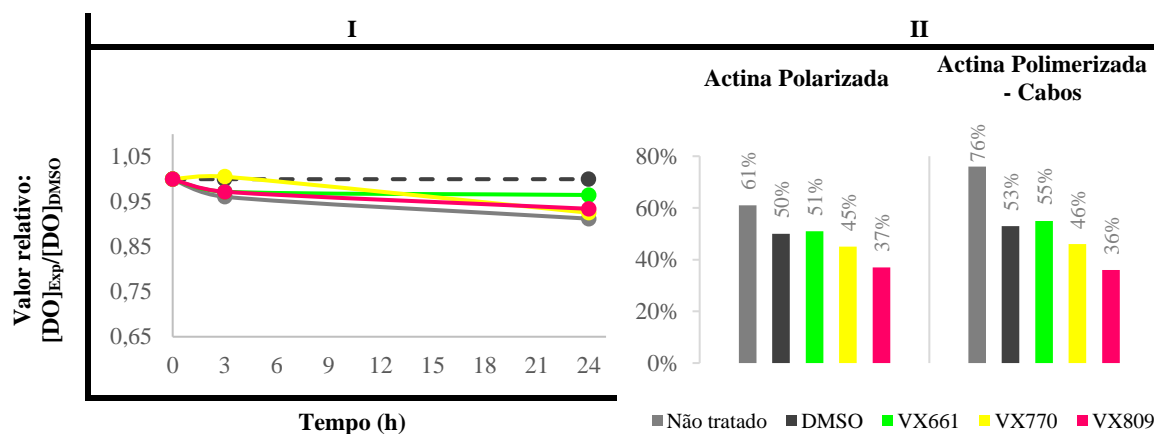


Figura 3.5 - Valor relativo da DO (**I**) e quantificação de actina polarizada e cabos (**II**) da estirpe BY4742 de *S. cerevisiae* após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (**A**) da transformação 1.

3.3 Estirpe derivada isogénica (#93TUBGFP)

Das cinco transformações realizadas apenas em duas foram obtidas colónias da estirpe isogénica (#93TUBGFP).

Como está representado na **Tabela 3.1**, a colónia **H** da transformação 4 foi a única com menor quantidade de células sem α -tubulina visível. No entanto, nesta transformação não foi obtida nenhuma colónia da estirpe selvagem, o que compromete a validação dos resultados desta colónia, como referido anteriormente.

Relativamente à distribuição da actina-F, identifica-se uma redução pouco significativa de cabos, nas culturas incubadas com VX-661, VX-770 e VX-809, e actina polarizada nas culturas incubadas com VX-770 e VX-809 **Figura 3.6**.

A variação dos valores da DO relativa ao DMSO nas culturas expostas às VX é muito subtil, não sendo possível identificar diferenças significativas entre o efeito das VX e o DMSO nas células (**Figura 3.7**).

A **Figura 3.8** representa as duas colónias (**K** e **L**) com maior quantidade de células sem α -tubulina visível, obtidas na transformação 5. Numa primeira análise, não se identifica uniformidade de resultados nas colónias **K** e **L**, o que seria de esperar entre réplicas biológicas. A variação das curvas nas colónias é bastante discrepante às 3 h, com uma diminuição dos valores relativos ao DMSO, na colónia **K** e um aumento na colónia **L**.

O padrão da distribuição da actina polimerizada é igualmente discrepante. Na colónia **K**, identifica-se uma diminuição da actina polarizada e cabos nas culturas expostas às VX, em oposição ao aumento da cultura exposta à VX661, na colónia **L**, nas mesmas condições.

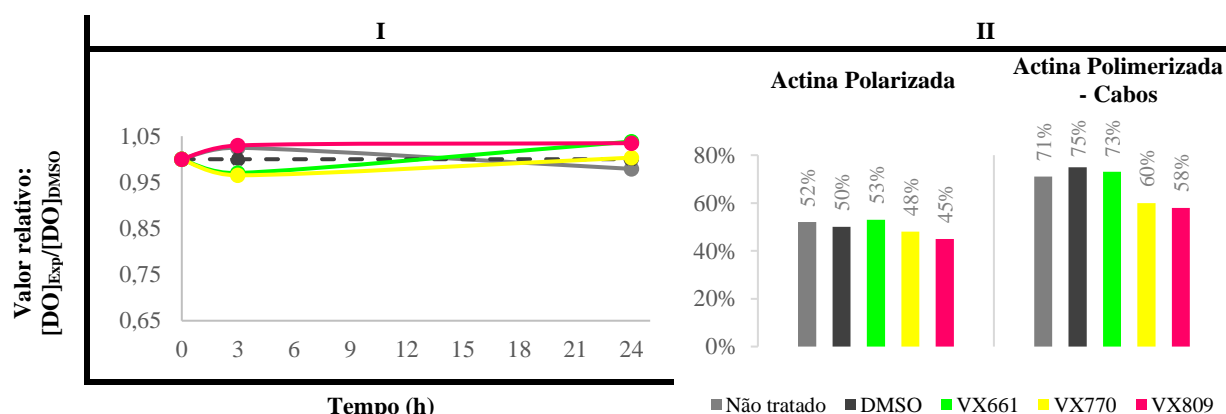


Figura 3.6 - Valor relativo da DO (**I**) e quantificação de actina polarizada e cabos (**II**) da estirpe BY4742 de *S. cerevisiae* após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónia (**H**) da transformação 4.

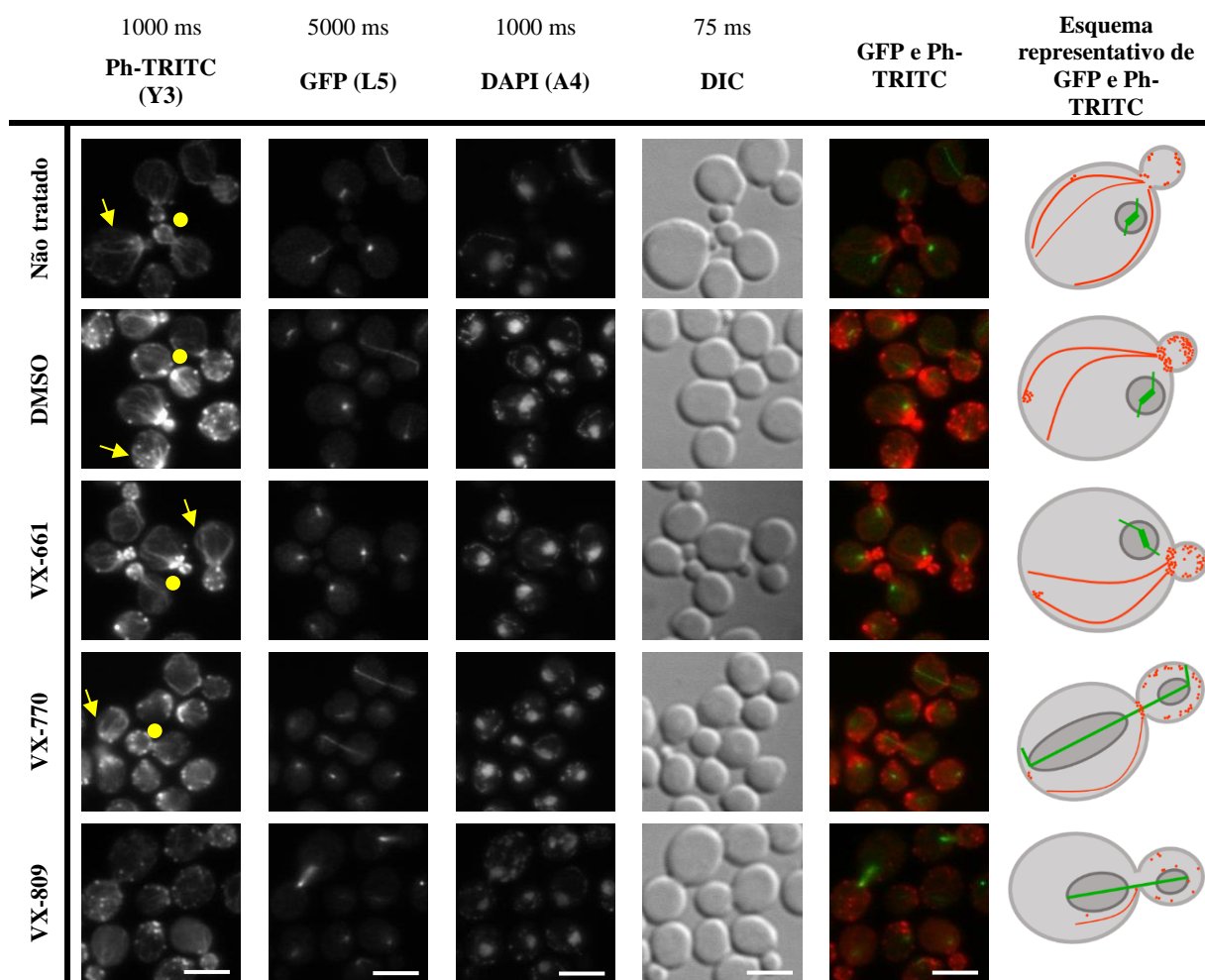


Figura 3.7 - Imagens representativas do citoesqueleto (actina-F e α -tubulina) da estirpe isogénica a BY4742, em células incubadas com DMSO, VX-661, VX-770 e VX-809 (10mM) durante 30 min. Colónia (H), da transformação 4. A primeira, segunda, terceira e quarta colunas correspondem, respetivamente, as imagens de microscopia de fluorescência de células a expressar actina-F marcada com TRITC conjugada com faloidina, α -tubulina, DNA nuclear e mitocondrial, e contraste de interferência diferencial. A quinta coluna corresponde à junção das imagens GFP (L5) e Ph-TRITC (Y3). A última coluna representa a distribuição de tubulina e actina-F. Seta: cabos, Bola: actina polarizada. Escala: 5 μ m

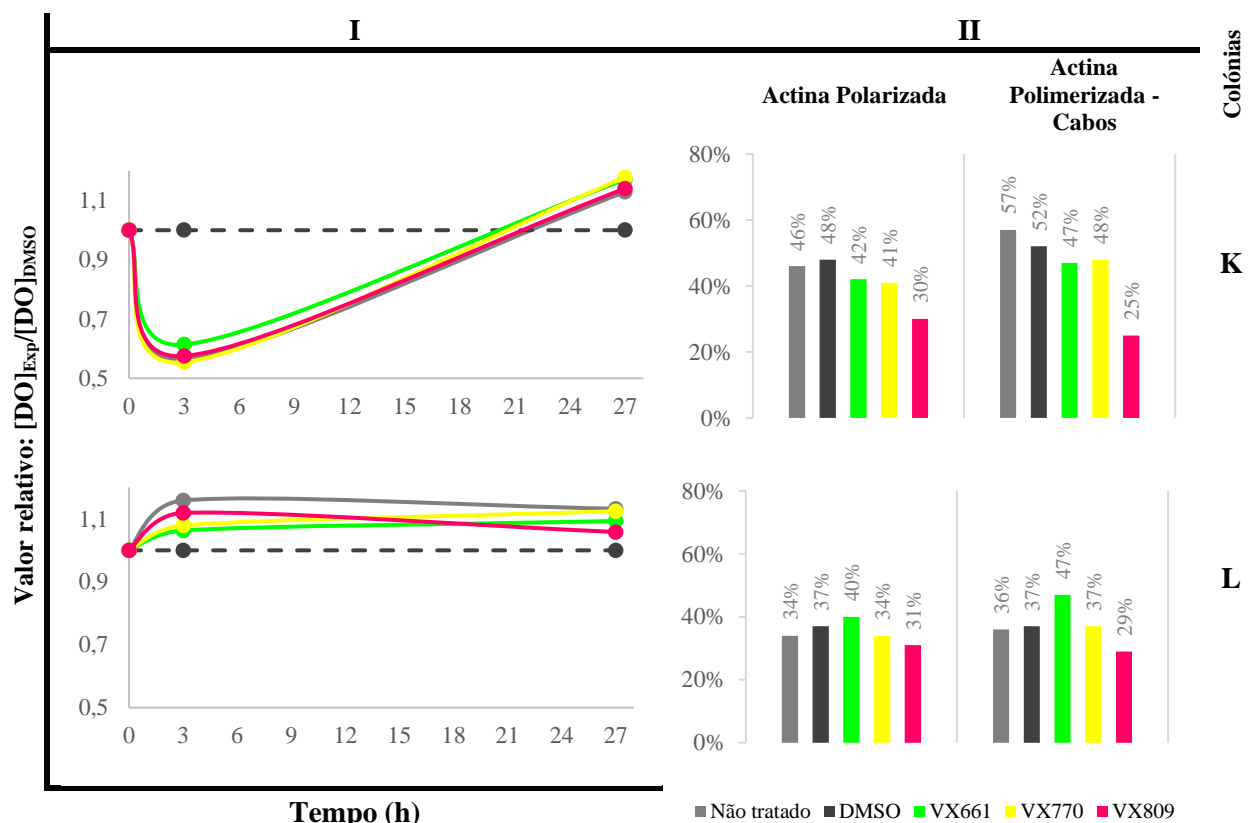


Figura 3.8 - Valor relativo da DO (I) e quantificação de actina polarizada e cabos (II) da estirpe isogénica a BY4742 de *S. cerevisiae* após exposição às VX-661, VX-770 e VX-809. Colónias (K) e (L) da transformação 5

3.3.1 Os moduladores VX não influenciam a distribuição de α -tubulina durante o ciclo celular

A estrutura e a polaridade dos microtúbulos foram mantidas nas culturas expostas a VX-661, VX-770, VX-809 e na cultura controlo (DMSO). Adicionalmente, não foram observadas alterações morfológicas nas células, independentemente da variação da distribuição de actina polarizada, cabos e *patches* (Tabela 3.2, Tabela 3.3 e Tabela 3.4). Esta análise foi apenas realizada nas colónias com menor quantidade de células sem α -tubulina visível.

Pelo facto da distribuição e tamanho dos microtúbulos variar consoante as diferentes fases do ciclo celular é possível identificar as várias etapas da divisão.

Na fase G1 (Figura 3.9), no início do ciclo celular, o núcleo das células de levedura *S. cerevisiae* contém apenas um corpo polar de fuso (não observados na Figura 3.9) do qual surgem os microtúbulos¹¹². Esta fase termina com o início da síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA)¹¹², a duplicação do corpo polar de fuso^{112,113} e a emergência da gémula¹¹² (Figura 3.9). Em seguida, as células entram em G2 e os corpos polares de fuso afastam-se para formar um fuso curto. Simultaneamente, a gémula cresce ao longo do ciclo celular^{73,112} (Figura 3.10). Na metáfase o núcleo migra para o colo da célula e segue-se um alongamento do fuso bifásico^{73,112} (Figura 3.10). Na anáfase (Figura 3.10), a divisão nuclear ocorre concomitantemente com o alongamento do fuso, os microtúbulos entram em contacto com a extremidade da gémula e vão encurtando à medida que o fuso se alonga²⁸. A citocinese ocorre após a formação de um anel de quitina⁹⁰ (não observado na Figura 3.11) e resulta na separação das duas células.

Tabela 3.2 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com maior quantidade de tubulina visível. Colônia (B) da transformação 1.

	DIC	Ph-TRITC: Actina polimerizada		Ph-TRITC: Actina polarizada		Ph-TRITC: Células com cabos de actina		Ph-TRITC: Células sem cabos de actina		GFP: Tubulina	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Não tratado	569	483	85%	234	48%	286	59%	197	41%	516	91%
DMSO	546	403	74%	206	51%	242	60%	161	40%	514	94%
B VX-661	703	644	92%	244	38%	354	55%	290	45%	644	92%
VX-770	930	852	92%	362	43%	397	47%	455	53%	852	92%
VX-809	732	640	87%	181	28%	230	36%	410	64%	699	95%

Tabela 3.3 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com maior quantidade de tubulina visível. Colônias (E) e (F) da transformação 2.

	DIC	Ph-TRITC: Actina polimerizada		Ph-TRITC: Actina polarizada		Ph-TRITC: Células com cabos de actina		Ph-TRITC: Células sem cabos de actina		GFP: Tubulina	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Não tratado	909	895	98%	369	41%	459	51%	428	48%	895	98%
DMSO	791	772	98%	314	41%	358	46%	414	54%	772	98%
E VX-661	637	624	98%	198	32%	197	32%	427	68%	619	97%
VX-770	885	832	94%	202	24%	163	20%	669	80%	832	94%
VX-809	868	821	95%	293	36%	297	36%	524	64%	821	95%
Não tratado	1183	1145	97%	428	37%	429	37%	716	63%	1145	97%
DMSO	840	808	96%	345	43%	384	48%	424	52%	808	96%
F VX-661	1366	1322	97%	526	39%	577	44%	745	56%	1322	97%
VX-770	1032	1002	97%	342	34%	353	35%	649	65%	1002	97%
VX-809	943	914	97%	252	28%	270	30%	644	70%	914	97%

Tabela 3.4 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com maior quantidade de tubulina visível. Colônia (G) da transformação 3.

	DIC	Ph-TRITC: Actina polimerizada		Ph-TRITC: Actina polarizada		Ph-TRITC: Células com cabos de actina		Ph-TRITC: Células sem cabos de actina		GFP: Tubulina	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Não tratado	1853	1817	98%	716	39%	1048	58%	769	42%	1817	98%
DMSO	1456	1430	98%	538	38%	782	55%	648	45%	1430	98%
G VX-661	1964	1945	99%	714	37%	1176	60%	769	39%	1943	99%
VX-770	1750	1719	98%	505	29%	758	44%	961	55%	1719	98%
VX-809	2064	2036	99%	458	23%	740	36%	1296	63%	2036	99%

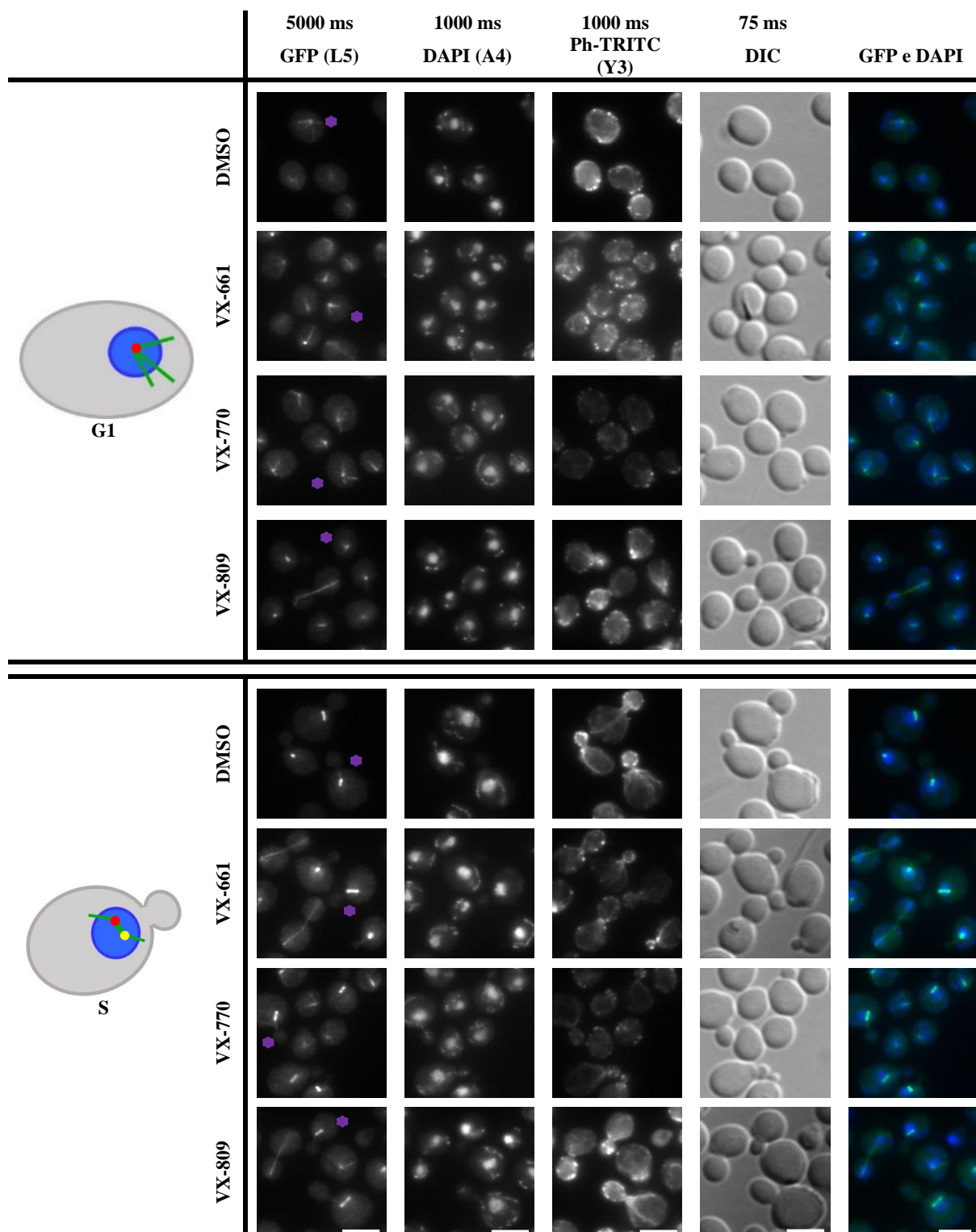


Figura 3.9 - Esquema representativo da organização de α -tubulina, na estirpe selvagem, nas fases G1 e S do ciclo celular, e em células incubadas com o controle (DMSO), VX-661, VX-770 e VX-809. Colônia (G), transformação 3. A primeira coluna representa a distribuição do núcleo e da α -tubulina durante o ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Huisman and Segal, 2005⁴⁹; Shaw *et al.*, 1997⁷³; Gibeaux *et al.*, 2017¹¹⁴). A segunda, terceira, quarta e quinta colunas correspondem, respectivamente, as imagens de microscopia de fluorescência de células a expressar α -tubulina, DNA nuclear e mitocondrial, actina-F marcada com TRITC conjugada com faloidina e contraste de interferência diferencial. A última coluna corresponde à junção das imagens GFP (L5) e DAPI (A4). Estrela roxa: célula representada no esquema. Bola vermelha: antigo corpo polar de fuso; bola amarela: novo corpo polar de fuso, ambos não identificados nas imagens. Escala: 5 μ m

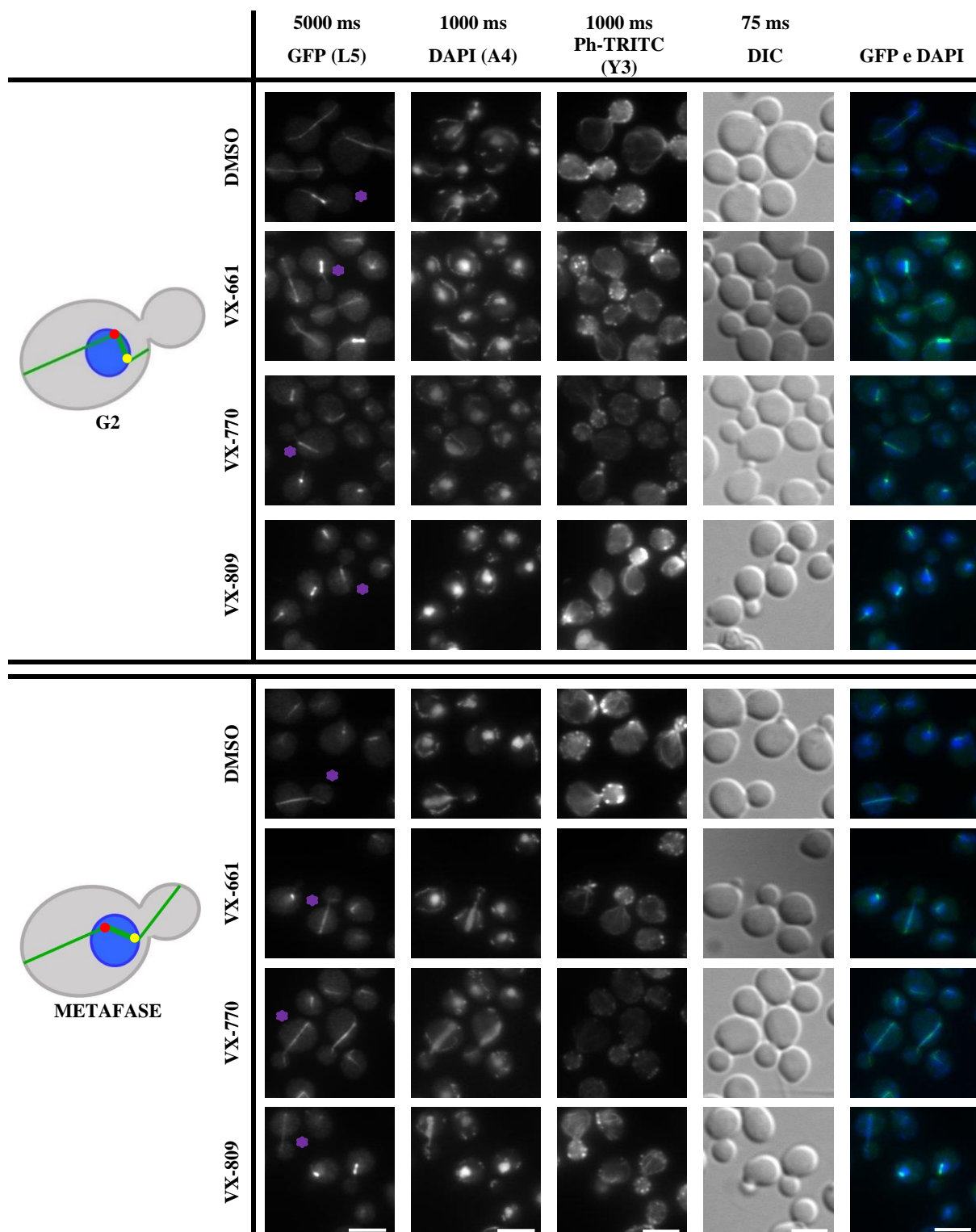


Figura 3.10 - Esquema representativo da organização de α -tubulina, na estirpe selvagem, na fase G2 e metáfase do ciclo celular, e em células incubadas com o controle (DMSO), VX-661, VX-770 e VX-809. Colônia (G), transformação 3. A primeira coluna representa a distribuição do núcleo e da α -tubulina durante o ciclo celular de *S. cerevisiae* (adaptado de Huisman and Segal, 2005⁴⁹; Shaw *et al.*, 1997⁷³; Gibeaux *et al.*, 2017¹¹⁴). A segunda, terceira, quarta e quinta colunas correspondem, respectivamente, as imagens de microscopia de fluorescência de células a expressar α -tubulina, DNA nuclear e mitocondrial, actina-F marcada com TRITC conjugada com faloidina e contraste de interferência diferencial. A última coluna corresponde à junção das imagens GFP (L5) e DAPI (A4). Estrela roxa: célula representada no esquema. Bola vermelha: antigo corpo polar de fuso; bola amarela: novo corpo polar de fuso, ambos não identificados nas imagens. Escala: 5 μ m

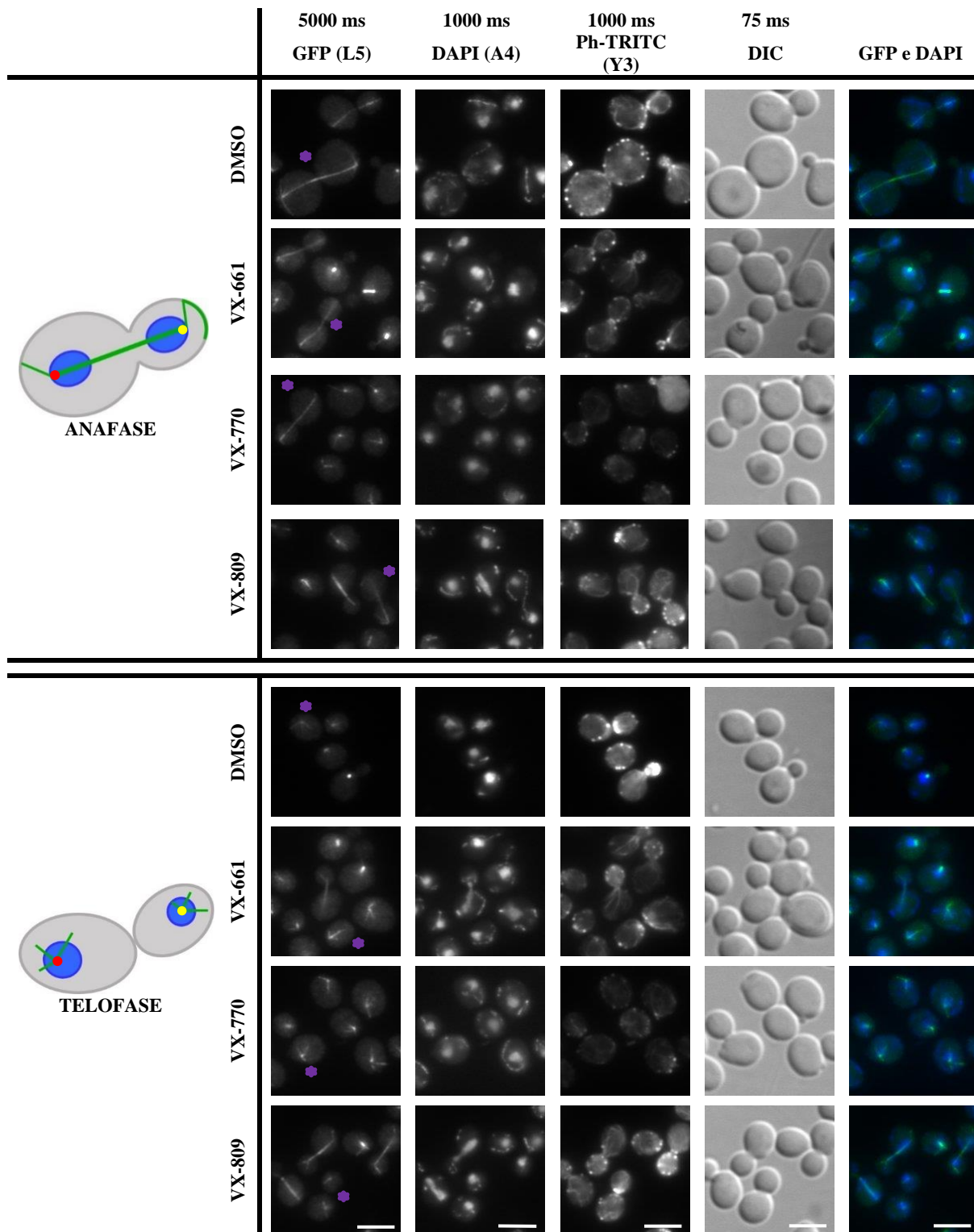


Figura 3.11 - Esquema representativo da organização de α -tubulina, na estirpe selvagem, nas anafase e telofase do ciclo celular, e em células incubadas com o controle (DMSO), VX-661, VX-770 e VX-809. Colônia (G), transformação 3. A primeira coluna representa a distribuição do núcleo e da α -tubulina durante o ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Huisman and Segal, 2005⁴⁹; Shaw *et al.*, 1997⁷³; Gibeaux *et al.*, 2017¹¹⁴). A segunda, terceira, quarta e quinta colunas correspondem, respectivamente, as imagens de microscopia de fluorescência de células a expressar α -tubulina, DNA nuclear e mitocondrial, actina-F marcada com TRITC conjugada com faloidina e contraste de interferência diferencial. A última coluna corresponde à junção das imagens GFP (L5) e DAPI (A4). Estrela roxa: célula representada no esquema. Bola vermelha: antigo corpo polar de fuso; bola amarela: novo corpo polar de fuso, ambos não identificados nas imagens. Escala: 5 μ m

4. Discussão

Após a análise dos resultados foi possível determinar várias condicionantes à eficácia e reprodutibilidade dos mesmos. Em primeiro lugar, a repetição de procedimentos experimentais requer condições idênticas, de forma a obter resultados que dependem apenas das variáveis em estudo. Neste trabalho são consideradas duas: o impacto dos moduladores CFTR na distribuição das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), e a utilização de duas estirpes *Saccharomyces cerevisiae*, uma estirpe selvagem BY4742 (#406) e uma estirpe derivada isogénica (#93). No entanto, a variabilidade dos resultados obtidos pode ser explicada por diferentes variáveis daquelas em estudo.

Das cinco transformações realizadas identificou-se um baixo número de colónias no meio seletivo CAA-URA (transformações 2 e 4), assim como uma diminuição no crescimento de colónias da estirpe isogénica (#93TUBGFP), comparativamente à estirpe selvagem (#406TUBGFP). Após a análise das células por microscopia de fluorescência foram identificadas três colónias da estirpe selvagem e duas colónias da estirpe isogénica com maior quantidade de células sem α -tubulina visível (entre 24% e 82%). Estes valores podem ter resultado da utilização de células velhas, com mais 30 d entre o descongelamento e a fixação.

A variabilidade dos resultados é demonstrada pela heterogeneidade das curvas de crescimento e pela análise da distribuição da actina-F. Simultaneamente, são identificadas variações entre réplicas biológicas, ou seja, colónias transformadas a partir do mesmo grupo de células, no mesmo dia, cujos procedimentos experimentais foram realizados simultaneamente. As réplicas biológicas são importantes porque detetam a variação dos efeitos biológicos aleatórios^{115,116} permitindo avaliar a reprodutibilidade dos procedimentos experimentais¹¹⁷. Estas diferenças devem, por esse motivo ser mínimas. No entanto, o mesmo não se verificou, e as colónias das transformações 1 e 2 são exemplos desta variabilidade. Do mesmo modo, a heterogeneidade relativa ao padrão da distribuição da actina e das curvas de crescimento é evidente, entre colónias da mesma estirpe.

A esta heterogeneidade de resultados podem estar associados o envelhecimento das células e erros técnicos executados durante o procedimento experimental. O envelhecimento das células de levedura condiciona a alteração de vários processos fisiológicos¹¹⁸, como o aumento da instabilidade genómica^{118,119}, a acumulação de mutações aleatórias¹²⁰, a diminuição da síntese proteica¹²¹ e a diminuição da resistência ao *stress*^{118,119,121}. Todos estes fatores contribuem para uma população celular heterogénea¹¹⁹.

Está descrito que enquanto as proteínas necessárias para a manutenção das funções básicas da célula (como por exemplo, proteínas expressas a partir de genes *housekeeping*) são expressas a taxas relativamente constantes entre células, o mesmo não se verifica em genes de resposta ao *stress*^{52,122-124}. Adicionalmente está documentado o papel de diversas proteínas de ligação à actina⁸³ envolvidas na resposta ao *stress* oxidativo^{78,125} e ao *stress* osmótico⁷⁷. Não é possível descartar a hipótese no aumento de *stress* do meio pelo envolvimento das VX, e do papel das proteínas acessórias do citoesqueleto em resposta a este estímulo externo^{83,126}. Desta forma, o envelhecimento das células pode condicionar o estudo, impossibilitando a confirmação desta hipótese.

4.1 A população celular de uma das colónias da estirpe selvagem é sensível aos efeitos de ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809)

Relativamente à utilização de DMSO como controlo, está descrito que este solvente orgânico tem baixa toxicidade e é utilizado como veículo para o tratamento celular com os moduladores VX¹⁰⁷. Desta forma, permite diferenciar os efeitos causados pelo mesmo dos que são exclusivos das VX. O efeito nas células é mínimo devendo ser possível identificar semelhanças na variação da DO da cultura incubada com DMSO e na cultura sem tratamento. A leitura da DO de apenas uma cultura vai de encontro a este pressuposto (colónia **G** da transformação 3) (**Figura 3.2**). Nesta colónia, o aumento da DO na última leitura (24 h), comparativamente com a leitura às 3 h, pode indicar uma adaptação celular à exposição das VX. Ainda que não seja possível confirmar o mecanismo pelo qual ocorre esta adaptação celular, as alterações na distribuição da actina poderão constituir a chave para a compreensão do mesmo.

Enquanto os *patches* distribuídos aleatoriamente estão associados a endossomas que levam informação do meio externo ao núcleo, os cabos despolarizados, pequenos e móveis estão associados a uma resposta celular ao *stress*. Após a análise dos resultados obtidos verifica-se a re-distribuição de *patches* e a despolarização e redução no número de cabos no córtex celular, que pode ocorrer devido a uma adaptação celular em resposta à exposição das células a ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809) (**Figura 4.1**).

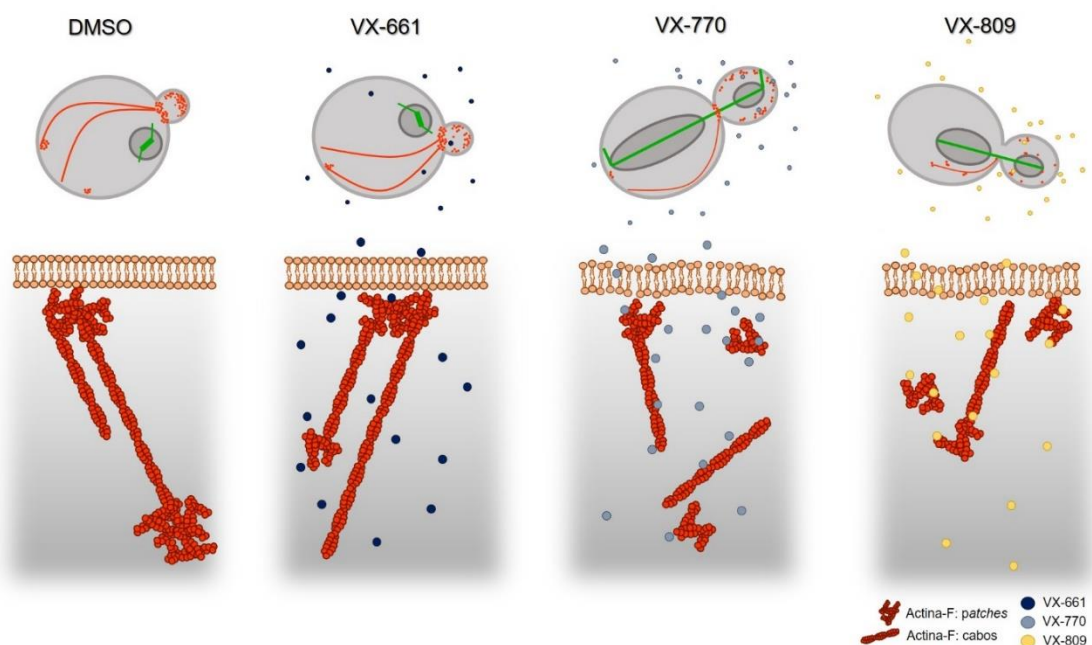


Figura 4.1 - Esquema representativo da distribuição de estruturas de actina-F (*patches* e cabos) em células incubadas com tezacaftor (VX-661), ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809), na estirpe selvagem. Na cultura de células incubadas com DMSO e tezacaftor (VX-661) identifica-se a polarização de *patches* e cabos, orientados em direção ao eixo da célula, e *patches* alinhados na extremidade dos cabos. Na cultura de células incubadas com ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809) é identificada a despolarização de *patches* e cabos, assim como a redução do número de cabos. Esta padrão na distribuição de estruturas de actina-F é mais acentuada nas células incubadas com lumacaftor (VX-809). Colónia (**G**), transformação 3. (Adaptado de ^{69,78,85,86,127,128}).

Este resultado é esperado e suportado pela bibliografia que descreve o papel da actina na regulação de stress osmótico⁷⁷, térmico¹²⁹ e oxidativo⁷⁸. A re-distribuição de *patches* pode estar associada a uma maior capacidade de comunicação entre a célula e os compostos ivacaftor (VX-770) e lumacaftor (VX-809).

O segundo resultado que apoia esta teoria é a despolarização e redução de cabos. Em diferentes situações de stress verifica-se a re-distribuição e a despolimerização da actina-F, causada pela instabilidade dinâmica⁸³. Este mecanismo de *turnover* característico dos filamentos de actina ocorre através da comunicação com diferentes proteínas acessórias como a cofilina. Esta proteína induz a despolimerização de actina-F e o aumento de actina-G no citoplasma¹³⁰. A actina-G associada à cofilina, pode intervir no aumento da transcrição de genes que codificam proteínas de stress^{86,131,132}, que por sua vez, têm um efeito protetor contra o mesmo¹³³.

Em embriões de *Drosophila*¹²⁹, por exemplo, foi demonstrada que o stress térmico induz a resposta ao stress actínico (*actin stress response* - ASR) através do aumento da actividade de cofilina. Neste artigo a cofilina é referida como sendo essencial para a acumulação nuclear dos filamentos de actina, actina-G, em resposta ao stress celular¹³⁴.

A associação entre a presença de filamentos de actina nuclear e a transcrição de proteínas de stress está igualmente descrita em mamíferos¹³⁰. De facto, foi demonstrado uma relação direta entre a redução de filamentos de actina citoplasmática e o aparecimento de filamentos de actina nuclear. No entanto, o método de deteção utilizado no artigo referido¹³⁰ não permite distinguir entre as isoformas actina-F e actina-G.

Apesar da literatura demonstrar um papel activo dos filamentos de actina na modulação da resposta celular ao stress em eucariotas, como leveduras e mamíferos, não é possível determinar, neste trabalho a veracidade deste pressuposto. A faloidina identifica, em microscopia de fluorescência, apenas a marcação citoplasmática de actina-F, o que impede a deteção da forma monomérica actina-G, ou de polímeros de actina-F muito curtos^{131,133}.

4.2 Os moduladores VX não afetam o ciclo celular

A polarização das estruturas da actina é crucial durante o ciclo celular porque determina o local da gemulação e depósito de quitina para a formação do anel contrátil^{51,67,72,83}. A análise da distribuição da actina-F identificou que as células são mais sensíveis aos compostos VX-770 e VX-809 comparativamente com a cultura controlo (DMSO), verificando-se uma redução do número de células polarizadas (cabos e/ou *patches*) (**Figura 3.3**) sem alterações morfológicas visíveis em nenhuma das colónias obtidas. Comparativamente, em células mutadas em ACT1 são identificadas gémulas múltiplas e anormalmente alongadas condicionadas pela ausência de concentração dos *patches* no local da gemulação.

Adicionalmente, nas leveduras *S. cerevisiae*, a função dos microtúbulos está associada à separação dos cromossomas durante a divisão celular^{73,88,90,135}. A análise dos resultados não identificou nenhum efeito da exposição dos compostos na tubulina, mantendo-se a estrutura e a polaridade dos microtúbulos, assim como, a manutenção da estrutura morfológica das células ao longo das diferentes fases do ciclo celular. Pelo facto de existir uma estreita correlação temporal entre a progressão do ciclo celular e as alterações morfológicas de *S. cerevisiae*, e considerando os resultados da distribuição da actina (**Tabela 3.2**, **Tabela 3.3** e **Tabela 3.4**), é possível concluir novamente que os compostos VX (10mM e incubação durante 30 min) não interferem no ciclo celular de *S. cerevisiae*.

Apesar destes resultados serem específicos em leveduras *S. cerevisiae*, a elevada conservação das unidades estruturais dos microtúbulos entre levedura e eucariotas superiores^{51,69,70} permite extrapolar que o mesmo resultado seria esperado em mamíferos, não se identificando nenhum efeito da exposição dos compostos na tubulina.

5. Conclusão

Neste estudo foi possível verificar que os moduladores da fibrose quística, tais como ivacaftor (VX-770) e o lumacaftor (VX-809) induzem uma redistribuição de *patches* e despolimerização de cabos actina-F e um aumento da sensibilidade durante o crescimento celular. Este resultado pode estar associado a uma adaptação das células ao meio condicionada pela comunicação dos filamentos de actina, *patches*, entre o meio extracelular e o núcleo, e pelo aumento da transcrição de genes que codificam proteínas de stress.

No entanto, este pressuposto é baseado em apenas uma colónia da estirpe selvagem #406 (BY4742). Devido à variabilidade de resultados e à fraca eficiência da transformação, não é possível identificar e validar as alterações celulares induzidas pelos compostos VX na estirpe isogénica (#93). Ensaios adicionais são necessários para testar a hipótese formulada.

6. Bibliografia

1. Genetics, M. & Diego, S. *Worldwide Survey of the AF508 Mutation. The American Journal of Human Genetics* (1989).
2. Kerem, B. *et al.* Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science* (80-.). **121**, (1989).
3. Riordan, J. R. *et al.* Identification the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* (80-.). **245**, (1989).
4. Rommens, J. M. *et al.* The Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science* (80-.). **122**, (1989).
5. Frizzell, R. A., Rechkemmer, G. & Shoemaker, R. L. Altered Regulation of Airway Epithelial Cell Chloride Channels in Cystic Fibrosis. *Science* (80-.). (1986). doi:10.1126/science.2425436
6. Boucher, R. C., Cantley, L. & Gatzky, J. T. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J. Clin. Invest.* **78**, 1245–1252 (1986).
7. Sosnay, P. R. *et al.* Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat. Genet.* 1–10 (2013). doi:10.1038/ng.2745
8. Report, A. D. ECFS Patient Registry Annual Data Report Annual Data Report. (2017).
9. Ooi, C. Y. & Durie, P. R. Cystic fibrosis from the gastroenterologist's perspective. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 175–185 (2016).
10. Marshall, B. *et al.* Patient Registry Annual Data. *Cystic Fibrosis Foundation* 92 (2018).
11. Higgins, C. F. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu Rev Cell Biol* 67–113 (1992). doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.
12. Klein, I. An inventory of the human ABC proteins. *Elsevier Sci.* **1461**, (1999).
13. Hasegawa, H. *et al.* A Multifunctional Aqueous Channel Formed by CFTR. *Science* (80-.). **258**, 1477–1479 (2016).
14. Naren, A. P. *et al.* CFTR Chloride Channel Regulation by an Interdomain Interaction. *Science* (80-.). **286**, 544–548 (2016).
15. Kopito, R. O. N. R. Biosynthesis and Degradation of CFTR. *Am. Physiol. Soc.* **79**, (2018).
16. Farinha, C. M. & Amaral, M. D. Most F508del-CFTR Is Targeted to Degradation at an Early Folding Checkpoint and Independently of Calnexin. *Am. Soc. Microbiol.* **25**, 5242–5252 (2005).
17. Koivula, F. N. M., Mcclenaghan, N. H., Harper, A. G. S., Kelly, C. & Kelly, C. Islet-intrinsic effects of CFTR mutation. *Diabetologia* (2016). doi:10.1007/s00125-016-3936-1
18. Prasad, R. Use of Potentiators and Correctors to Rescue the Various Effects of Mutations in Cystic Fibrosis. *J. Gene Ther. Res.* 1–11 (2018). doi:10.29199/GENE.101014
19. Manuscript, A. Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol. Biosyst.* **5**, 123–127 (2009).
20. Pilewski, J. M. & Frizzell, R. A. Role of CFTR in Airway Disease. *Am. Physiol. Soc.* **79**, 215–255 (2018).
21. Borowitz, D. CFTR, Bicarbonate, and the Pathophysiology of Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **30**, 24–30 (2015).
22. Jr, C. R. E. *et al.* Mucus accumulation in the lungs precedes structural changes and infection in children with cystic fibrosis. *Sci. Transl Med.* **3488**, (2019).
23. Gibson, R. L., Burns, J. L. & Ramsey, B. W. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 918–951 (2003).
24. Cutting, G. (Johns H. U. *et al.* The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Available at: https://cfr2.org/about_cfr2. (Accessed: 18th August 2020)
25. Ratjen, F. *et al.* Cystic fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15010 (2015).
26. Serohijos, A. W. R. *et al.* Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic – membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2008).
27. Jensen, T. J. *et al.* Multiple Proteolytic Systems, Including the Proteasome, Contribute to CFTR Processing. *Cell Press* **83**, 129–135 (1995).
28. Parad, R. B. Heterogeneity of phenotype in two cystic fibrosis patients homozygous for the CFTR exon 11 mutation G551D. *J. Med. Genet.* **1**, 711–713 (1996).
29. Habib, A. R. *et al.* A Systematic Review of the Clinical Efficacy and Safety of CFTR Modulators

- in Cystic Fibrosis. *Sci. Rep.* 1–9 (2019). doi:10.1038/s41598-019-43652-2
30. Goor, F. Van *et al.* Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18825–18830 (2009).
 31. Willsie, S. K. Effect of VX-770 in Persons with Cystic Fibrosis and the G551D-CFTR Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 30–32 (2011).
 32. Bell, S. C. *et al.* A CFTR Potentiator in Patients With Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *N. Engl. J. Med.* 1663–1672 (2011). doi:10.1056/NEJMoa1105185
 33. Uliyakina, I., Farinha, C. M., Sousa, M., Canato, S. & Amaral, M. D. Increased efficacy of VX-809 in different cellular systems results from an early stabilization effect of F508del-CFTR. *Pharmacol. Res. Perspect.* 1–12 (2015). doi:10.1002/prp2.152
 34. Henriques, J. *et al.* Article Revertants, Low Temperature, and Correctors Reveal the Mechanism of F508del-CFTR Rescue by VX-809 and Suggest Multiple Agents for Full Correction. *Chem. Biol.* 943–955 (2013). doi:10.1016/j.chembiol.2013.06.004
 35. Loo, T. W. & Clarke, D. M. Corrector VX-809 promotes interactions between cytoplasmic loop one and the first nucleotide-binding domain of CFTR. *Biochem. Pharmacol.* **136**, 24–31 (2017).
 36. Sala, M. & Jain, M. Tezacaftor for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* **0**, 1 (2018).
 37. Clancy, J. P. *et al.* Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* (2012). doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200393
 38. He, L. *et al.* Correctors of F508del CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *Cell Press* **13**, (2013).
 39. Heijerman, H. G. M. *et al.* Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Elsevier Ltd.* **6736**, 6–14 (2019).
 40. Mckee, C. M. *et al.* Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *New Engl. J. Med.* 1–10 (2019). doi:10.1056/NEJMoa1908639
 41. Ridley, K. & Condren, M. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor: The First Triple- Combination Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulating Therapy. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* (2020). doi:10.5863/1551-6776-25.3.192
 42. Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 Genes. *Science* (80-.). **274**, (1996).
 43. Botstein, D. & Fink, G. R. Yeast: An Experimental Organism for Modern Biology. *Science* (80-.). **1**, (1985).
 44. Started, G. & Yeast, W. Getting Started with Yeast. *Elsevier Sci.* **350**, (2002).
 45. Steinmetz, L. M. *et al.* Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet.* **31**, 400–404 (2002).
 46. Henderson, K. A. & Gottschling, D. E. A Mother’s Sacrifice: What is She Keeping for Herself? *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 723–728 (2009).
 47. Kupiec, M. Biology of telomeres: lessons from budding yeast. *Microbiol. Rev.* (2014). doi:10.1111/1574-6976.12054
 48. Longo, V. & Fabrizio, P. Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell. Biochem.* 101–121 (2014). doi:10.1007/978-94-007-2561-4
 49. Huisman, S. M. & Segal, M. Cortical capture of microtubules and spindle polarity in budding yeast – where’s the catch? *J. Cell Sci.* (2005). doi:10.1242/jcs.01650
 50. Lew, D. J. & Reed, S. I. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1995).
 51. Signaling, C., Bi, E. & Park, H. Cell Polarization and Cytokinesis in Budding Yeast. *Genetics* **191**, 347–387 (2012).
 52. Holland, S. L., Reader, T., Dyer, P. S. & Avery, S. V. Phenotypic heterogeneity is a selected trait in natural yeast populations subject to environmental stress. *Environ. Microbiol.* **16**, 1729–1740 (2014).
 53. Amorim, A. F., Pinto, D., Kuras, L. & Fernandes, L. Absence of Gim proteins, but not GimC complex, alters stress-induced transcription. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1860**, 773–781 (2017).
 54. Bradamante, S. *et al.* Oxidative stress and alterations in actin cytoskeleton trigger glutathione

- efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA - Mol. Cell Res.* **1803**, 1376–1385 (2010).
55. Baudin, A., Denouel, A., Lacroute, F. & Cullin, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329–3330 (1993).
 56. Lorenz, M. C. *et al.* Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **158**, 113–117 (1995).
 57. Schneider, R. Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast. (Université de Fribourg, 2004).
 58. Duina, A. A., Miller, M. E. & Keeney, J. B. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**, 33–48 (2014).
 59. Bharucha, N. & Kumar, A. Yeast Genomics and Drug Target Identification. 618–634 (2007).
 60. Ausubel, F. M. *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. (2003).
 61. Gasch, A. P. *et al.* Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257 (2000).
 62. Olivares-marin, I. K., González-hernández, J. C., Regalado-gonzalez, C. & Madrigal-perez, L. A. *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. *J. Vis. Exp.* 1–10 (2018). doi:10.3791/58192
 63. Busti, S. *et al.* Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sensors* 6195–6240 (2010). doi:10.3390/s100606195
 64. Herskowitz, I. R. A. & Of, T. Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. Soc. Microbiol.* **52**, 536–553 (1988).
 65. Rinaldi, T., Dallabona, C., Ferrero, I., Frontali, L. & Bolotin-fukuhara, M. Mitochondrial diseases and the role of the yeast models. *FEMS Yeast Res.* **10**, 1006–1022 (2010).
 66. Li, R. & Gundersen, G. G. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 860–873 (2008).
 67. Mishra, M., Huang, J. & Balasubramanian, M. K. The yeast actin cytoskeleton. *FEMS Microbiol Rev* (2014). doi:10.1111/1574-6976.12064
 68. Chiou, J., Balasubramanian, M. K. & Lew, D. J. Cell Polarity in Yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1–25 (2017). doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060856
 69. Moseley, J. B. & Goode, B. L. The Yeast Actin Cytoskeleton: from Cellular Function to Biochemical Mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 605–645 (2006).
 70. Botstein, D., Chervitz, S. A. & Cherry, J. M. Yeast as a Model Organism. *Science (80-.)*. **277**, 1259–1260 (2011).
 71. Chen, C., Yin, Y., Tu, Q. & Yang, H. Glucose and amino acid in enterocyte: absorption, metabolism and maturation. *Front. Biosci.* 1721–1739 (2018). doi:10.2741/4669
 72. Amberg, D. C. Three-dimensional Imaging of the Yeast Actin Cytoskeleton through the Budding Cell Cycle □. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3259–3262 (1998).
 73. Shaw, S. L., Yeh, E., Maddox, P., Salmon, E. D. & Bloom, K. Astral Microtubule Dynamics in Yeast: A Microtubule-based Searching Mechanism for Spindle Orientation and Nuclear Migration into the Bud. *J. Cell Biol.* **139**, 985–994 (1997).
 74. Water, R. D., Pringle, J. R. & Kleinsmith, L. J. Identification of an Actin-Like Protein and of Its Messenger Ribonucleic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **144**, 1143–1151 (1980).
 75. Pearson, R. D. & Hewlett, E. L. Lethal Disruption of the Yeast Actin Gene by Integrative DNA Transformation. *Science (80-.)*. 371–373 (1982). doi:10.1126/science.7046050
 76. Melak, M., Plessner, M. & Grosse, R. Actin visualization at a glance. *J. Cell Sci.* 1–6 (2017). doi:10.1242/jcs.189068
 77. Smith, K. W. & Biology, C. Osmotic Stress and the Yeast Cytoskeleton: Phenotype-specific Suppression of an Actin Mutation. *J. Cell Biol.* **118**, 561–571 (1992).
 78. Torre-ruiz, M. A. De, Pujol, N. & Sundaran, V. Coping With Oxidative Stress. The Yeast Model. *Curr. Cancer Drug Targets* 2–12 (2015). doi:10.2174/1389450115666141020160105
 79. Ho, J. & Bretscher, A. Ras Regulates the Polarity of the Yeast Actin Cytoskeleton through the Stress Response Pathway. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1541–1555 (2001).
 80. Kilmartin, J. V & Adams, A. E. M. Structural Rearrangements of Tubulin and Actin during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* **98**, (1984).
 81. Huckaba, T. M., Gay, A. C., Pantalena, L. F., Yang, H. & Pon, L. A. Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 519–530 (2003).

doi:10.1083/jcb.200404173

82. Yang, H. & Pon, L. A. Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, (2001).
83. Waddle, J. A., Karpova, T. S., Waterston, R. H. & Cooper, J. A. Movement of Cortical Actin Patches in Yeast. *J. Cell Biol.* **132**, 861–870 (1996).
84. Doyle, T. I. M. & Botstein, D. Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 3886–3891 (1996).
85. Karpova, T. S., McNally, J. G., Moltz, S. L. & Cooper, J. A. Assembly and function of the actin cytoskeleton of yeast: Relationships between cables and patches. *J. Cell Biol.* **142**, 1501–1517 (1998).
86. Mounier, N. & Lyon, C. B. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* **7**, 167–176 (2002).
87. Adams, A. E. M., Cooper, J. A. & Drubint, D. G. Unexpected Combinations of Null Mutations in Genes Encoding the Actin Cytoskeleton Are Lethal in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **4**, 459–468 (1993).
88. Kilmartin, J. V & Kilmartin, J. V. Lessons from yeast: the spindle pole body and the centrosome. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci* (2014). doi:10.1098/rstb.2013.0456
89. Moran, K. D. *et al.* Cell-cycle control of cell polarity in yeast. *J. Cell Biol.* 1–19 (2018).
90. Jacobs, C. W., Adams, A. E. M., Szanislo, P. J. & John, R. Functions of Microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *J. Cell Biol.* **107**, 1409–1426 (1988).
91. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J. & Caputo, E. Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast - Johns Hopkins Univ.* **132**, 115–132 (1998).
92. Suga, M., Isobe, M. & Hatakeyama, T. Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient electroporation. *Yeast* 889–896 (2000). doi:10.1002/1097-0061(200007)16:10<889::AID-YEA582>3.0.CO;2-R
93. Scudellari, M. Mechanisms of Cryoprotection. (2013).
94. Best, B. P. & Extension, L. Cryoprotectant Toxicity: Facts, issues and questions. *Rejuvenation Research* 1–58 (2015). doi:10.1089/rej.2014.1656
95. Jermini, M. F. G. & Schmidt-lorenz, W. Influence of Frozen Storage and Thaw-Freeze Stresses on the Viability of Osmotolerant Yeasts. *J. Food Prot.* **50**, 414–417 (1987).
96. Jeong, S., Le, A., Lee, K. The viability and recovery of *Saccharomyces Cerevisiae* after freezing at -84°C with different concentrations of glycerol. *Open J. Syst.* (2012).
97. Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 339–346 (1989).
98. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations. *Am. Soc. Microbiol.* **153**, 163–168 (1983).
99. Anh, T. & Shigeyuki, P. Visualization of the synergistic effect of lithium acetate and single-stranded carrier DNA on *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Curr. Genet.* 233–239 (2011). doi:10.1007/s00294-011-0341-7
100. Chen, P. *et al.* Visualized investigation of yeast transformation induced with Li⁺ and polyethylene glycol. *Talanta* **77**, 262–268 (2008).
101. Anh, T. & Shigeyuki, P. The Role of Cell Wall Revealed by the Visualization of *Saccharomyces cerevisiae* Transformation. *Curr. Microbiol.* 956–961 (2011). doi:10.1007/s00284-010-9807-y
102. Kuwano, T., Shirataki, C. & Itoh, Y. Comparison between polyethylene glycol and polyethylenimine-mediated transformation of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 95–103 (2008). doi:10.1007/s00294-008-0204-z
103. Kawai, S., Hashimoto, W. & Murata, K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Bioeng. Bugs* 395–403 (2010). doi:10.4161/bbug.1.6.13257
104. Irma M. Van Die; Hans E. N. Bergmans; Wiel P. M. Hoekstra. Transformation in *Escherichia coli*: Studies on the Role of the Heat Shock in Induction of Competence. *Microbiol. Soc.* 663–670 (1983).
105. Hamedi, H., Misaghi, A., Modarressi, M. H. & Salehi, T. Z. Generation of a Uracil Auxotroph Strain of the Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* as a Host for the Recombinant Protein Production. *Avicenna J Med Biotechnol* **5**, 29–34 (2013).

106. Prescott, L. M., Klein, P. H. & Joanne Willey, Christopher J. Woolverton, L. S. *Prescott's Microbiology*. (2002).
107. Yuan, C. *et al.* Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. *PLoS One* **9**, (2014).
108. D. Bancroft, John; Gamble, M. Theory and Practice of Histological Techniques. in 742 (Elsevier, 2008).
109. Kilgore, J. A., Dolman, N. J. & Davidson, M. W. A Review of Reagents for Fluorescence Microscopy of Cellular Compartments and Structures. *Curr. Protoc. Cytom.* 1–17 (2014). doi:10.1002/0471142956.cy1232s67
110. Mund, M., Kaplan, C. & Ries, J. Localization microscopy in yeast. *Methods Cell Biol.* **123**, 253–271 (2014).
111. Holmes, T. The wild type as concept and in experimental practice: A history of its role in classical genetics and evolutionary theory. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **63**, 15–27 (2017).
112. Hartwell, L. H. *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *J. Bacteriol. Rev.* **38**, 164–198 (1974).
113. Crasta, K. & Surana, U. Disjunction of conjoined twins: Cdk1, Cdh1 and separation of centrosomes. *Cell Div.* **8**, 1–8 (2006).
114. Gibeaux, R., Politi, A. Z., Philippsen, P., Nédélec, F. & Mogilner, A. Mechanism of nuclear movements in a multinucleated cell. *Mol. Biol. Cell* **28**, (2017).
115. Gan, C. S., Chong, P. K., Pham, T. K. & Wright, P. C. Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J. Proteome Res.* 821–827 (2007). doi:10.1021/pr060474i
116. Blainey, Paul ; Krzywinski, Martin; Altman, N. Replication. *Nat. Methods* **11**, 1–2 (2014).
117. Sha, W., Martins, A. M., Laubenbacher, R., Mendes, P. & Shulaev, V. The Genome-Wide Early Temporal Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Oxidative Stress Induced by Cumene Hydroperoxide. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
118. Gourlay, C. W. *et al.* A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J. Cell Biol.* 803–809 (2003). doi:10.1083/jcb.200310148
119. Knorre, D. A., Azbarova, A. V, Galkina, K. V, Feniouk, B. A. & Severin, F. F. Aging imparts heterogeneity to yeasts. *Mech. Ageing Dev.* (2018). doi:10.1016/j.mad.2018.09.001
120. Patterson, M. N. & Maxwell, P. H. Combining Magnetic Sorting of Mother Cells and Fluctuation Tests to Analyze Genome Instability During Mitotic Cell Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Vis. Exp.* 1–13 (2014). doi:10.3791/51850
121. Sinclair, D., Mills, K. & Guarente, L. Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* (1998). doi:10.1146/annurev.micro.52.1.533
122. Bar-even, A. *et al.* Noise in protein expression scales with natural protein abundance. *Nat. Genet.* **38**, 636–643 (2006).
123. Newman, J. R. S. *et al.* Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature* **441**, (2006).
124. Lehner, B. Selection to minimise noise in living systems and its implications for the evolution of gene expression. *Mol. Syst. Biol.* (2008). doi:10.1038/msb.2008.11
125. Farah, M. E. & Amberg, D. C. Conserved Actin Cysteine Residues Are Oxidative Stress Sensors That Can Regulate Cell Death in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1359–1365 (2007).
126. Drees, B. *et al.* Tropomyosin Is Essential in Yeast, Yet the TPM1 and TPM2 Products Perform Distinct Functions. *J. Cell Biol.* **128**, 383–392 (1995).
127. Suzuki, G. *et al.* Evaluation of image processing programs for accurate measurement of budding and fission yeast morphology. *Curr. Genet.* 237–247 (2006). doi:10.1007/s00294-005-0051-0
128. Goode, B. L., Eskin, J. A. & Wendland, B. Actin and Endocytosis in Budding Yeast. *Genetics* **199**, 315–358 (2015).
129. Figard, L. *et al.* Cofilin-Mediated Actin Stress Response Is Maladaptive in Heat-Stressed Embryos. *Cell Rep.* **26**, 3493–3501.e4 (2019).
130. Welch, W. I. & Suhan, J. P. Morphological Study of the Mammalian Stress Response Characterization of Changes in Cytoplasmic Organelles, Cytoskeleton, and Nucleoli, and Appearance of Intranuclear Actin Filaments in Rat Fibroblasts after Heat-Shock Treatment. *J. Cell Biol.* **101**, (1985).
131. Tfiid, M., Bettinger, B. T., Gilbert, D. M. & Amberg, D. C. Actin up in the nucleus. *Nat. Publ.*

- Gr.* **5**, 410–415 (2004).
132. Olave, I. A., Reck-peterson, S. L. & Crabtree, G. R. Nuclear actin and actin related proteins in chromatin remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* (2002). doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135507
 133. Grosse, R. & Vartiainen, M. K. To be or not to be assembled: filaments into nuclear actin filaments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **80**, (2013).
 134. Falahzadeh, K. *et al.* The Potential Roles of Actin in The Nucleus. *CELL J.* **17**, 7–14 (2015).
 135. Bergman, Z. J., Wong, J., Drubin, D. G. & Barnes, G. Microtubule Dynamics Regulation Reconstituted in Budding Yeast Lysates. *J. Cell Sci.* (2018). doi:10.1242/jcs.219386
 136. Chiaw, P. K., Eckford, P. D. W. & Bear, C. E. Insights into the mechanisms underlying CFTR channel strategies for therapy. *Essays Biochem.* 233–248 (2011). doi:10.1042/BSE0500233
 137. Hanukoglu, I., Hanukoglu, A. & Aviv, T. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene* **579**, 95–132 (2017).
 138. Cholon, D. M. *et al.* Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DF508 CFTR in cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **6**, 1–11 (2014).
 139. Botelho, H. M. *et al.* Protein Traffic Disorders: an Effective High-Throughput Fluorescence Microscopy Pipeline for Drug Discovery. *Sci. Rep.* 1–8 (2015). doi:10.1038/srep09038

7. Anexos

7.1 Anexo I

Tabela 7.1 - Data dos procedimentos experimentais da estirpe selvagem BY4742 (#406).

Colónias	Data				
	Descongelamento das células	Transformação	Confirmação da integração do plasmídeo	Exposição das células às VX	Aquisição
(A) #406tubgfp_#2	18/04/2019	05/05/2019	25/05/2019	10/06/2019	06/07/2019
(B) #406tubgfp_#2	18/04/2019	05/05/2019	25/05/2019	10/06/2019	06/07/2019
(C) #406tubgfp_#4	18/04/2019	05/05/2019	25/05/2019	09/06/2019	13/07/2019
(D) #406tubgfp_#5	18/04/2019	05/05/2019	25/05/2019	09/06/2019	13/07/2019
(E) #406tubgfp_#1	03/06/2019	08/06/2019	24/06/2019	30/06/2019	21/07/2019
(F) #406tubgfp_#2	03/06/2019	08/06/2019	24/06/2019	30/06/2019	21/07/2019
(G) #406tubgfp_#4	03/06/2019	23/06/2019	06/07/2019	14/07/2019	20/07/2019

Tabela 7.2 - Data dos procedimentos experimentais da estirpe isogénica a BY4742 (#93).

Colónias	Data				
	Descongelamento das células	Transformação	Confirmação da integração do plasmídeo	Exposição das células às VX	Aquisição
(H) #93tubgfp_#1	04/05/2019	26/05/2019	08/06/2019	30/06/2019	21/07/2019
(K) #93tubgfp_#1	03/06/2019	23/06/2019	06/07/2019	21/07/2019	28/07/2019
(L) #93tubgfp_#2	03/06/2019	23/06/2019	06/07/2019	21/07/2019	28/07/2019

7.2 Anexo II

Tabela 7.3 - Intervalo de tempo entre os diferentes procedimentos experimentais da estirpe selvagem BY4742 (#406).

Identificação das colónias	Data da transformação	Intervalo de tempo (d)			
		Descongelação das células até à transformação	Transformação e a confirmação dos transformantes	Confirmação dos transformantes à exposição das células às VX	Exposição das células às VX e a visualização das células pela microscopia de fluorescência
A	05 de Maio de 2019	17 d	20 d	16 d	26 d
B					
C		17 d	20 d	15 d	34 d
D					
E	08 de Junho de 2019	5 d	16 d	6 d	21 d
F					
G	23 de Junho de 2019	20 d	13 d	41 d	6 d

Tabela 7.4 - Intervalo de tempo entre os diferentes procedimentos experimentais da estirpe isogénica a BY4742 (#93).

Identificação das colónias	Data da transformação	Intervalo de tempo (d)			
		Descongelação das células até à transformação	Transformação e a confirmação dos transformantes	Confirmação dos transformantes à exposição das células às VX	Exposição das células às VX e a visualização das células pela microscopia de fluorescência
H	26 de Maio de 2019	22 d	13 d	22 d	21 d
K	23 de Junho de 2019	20 d	13 d	15 d	7 d
L					

7.3 Anexo III

Tabela 7.5 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes das colônias **A** e **B** da transformação 1 (tempo 0: imediatamente antes da adição das VX às culturas, após 3 h e 24 h de exposição).

	TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809		TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809
A	0H	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	A	0	1	1	1	1	1
	3H	1.72	1.79	1.74	1.8	1.74		3	0.961	1	0.972	1.006	0.972
	24H	2.08	2.28	2.2	2.11	2.13		24	0.912	1	0.965	0.925	0.934
B	0H	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	B	0	1	1	1	1	1
	3H	2.11	2.27	2.16	2.09	2.11		3	0.93	1	0.952	0.921	0.929
	24H	2.75	2.75	2.71	2.89	2.69		24	1	1	0.985	1.051	0.978
não-normalizado							normalizado						

Tabela 7.6 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes das colônias **C** e **D** da transformação 1 (tempo 0: imediatamente antes da adição das VX às culturas, após 3 h e 24 h de exposição).

	TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809		TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809
C	0H	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	C	0	1	1	1	1	1
	3H	1.35	1.3	1.34	1.38	1.35		3	1.038	1	1.031	0.769	1.038
	24H	3.02	3.03	3.09	3.15	3.09		24	0.997	1	1.02	1.039	1.02
D	0H	0.776	0.776	0.776	0.776	0.776	D	0	1	1	1	1	1
	3H	1.3	1.29	1.3	1.36	1.32		3	1.008	1	1.008	1.054	1.023
	24H	2.88	2.89	2.78	2.89	3.06		24	0.997	1	0.962	1	1.059
não-normalizado							normalizado						

Tabela 7.7 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO 600 nm em três tempos diferentes das colônias **E** e **F** da transformação 2 (tempo 0: imediatamente antes da adição das VX às culturas, após 3 h e 24 h de exposição).

	TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809		TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809
E	0H	0.744	0.744	0.744	0.744	0.744	E	0	0	1	1	1	1
	3H	1.76	1.797	1.76	1.87	1.74		3	3	0.979	1	0.979	1.041
	24H	2.53	2.68	2.62	2.42	2.4		24	24	0.944	1	0.978	0.903
F	0H	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	F	0	0	1	1	1	1
	3H	1.7	1.74	1.71	1.69	1.701		3	3	0.977	1	0.983	0.971
	24H	2.48	2.51	2.44	2.41	2.38		24	24	0.988	1	0.972	0.96
não-normalizado							normalizado						

Tabela 7.8 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO_{600 nm} em três tempos diferentes da colônia **G** da transformação 3 (tempo 0: imediatamente antes da adição das VX às culturas, após 3 h e 24 h de exposição).

	TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809		TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809
G	0H	0.728	0.728	0.728	0.728	0.728	G	0	1	1	1	1	1
	3H	1.35	1.3	1.1	1.07	1.01		3	1.038	1	0.846	0.823	0.777
	24H	2.08	2.06	2.13	2.07	2.1		24	1.01	1	1.034	1.005	1.019
não-normalizado							normalizado						

Tabela 7.9 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO_{600 nm} em três tempos diferentes da colônia **H** da transformação 4 (tempo 0: imediatamente antes da adição das VX às culturas, após 3 h e 24 h de exposição).

TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809	TEMPO		TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809
H	0H	0.752	0.752	0.752	0.752	0.752	H	0	1	1	1	1	1
	3H	2.06	2.01	1.95	1.94	2.07		3	1.025	1	0.970	0.965	1.030
	24H	2.81	2.87	2.98	2.88	2.97		24	0.979	1	1.038	1.003	1.035
não-normalizado							normalizado						

Tabela 7.10 - Leitura das curvas de crescimento. Valores normalizados e não normalizados da medição da DO_{600 nm} em três tempos diferentes das colônias **K** e **L** da transformação 5 (tempo 0: imediatamente antes da adição das VX às culturas, após 3 h e 24 h de exposição).

	TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809		TEMPO	não tratado	DMSO	VX-661	VX-770	VX-809
E	0H	0.788	0.788	0.788	0.788	0.788	E	0	1	1	1	1	1
	3H	1.61	2.85	1.75	1.58	1.64		3	0.565	1	0.614	0.554	0.575
	24H	2.97	2.63	3.08	3.1	3		24	1.129	1	1.171	1.179	1.141
F	0H	0.684	0.684	0.684	0.684	0.684	F	0	1	1	1	1	1
	3H	1.46	1.26	1.34	1.36	1.41		3	1.159	1	1.063	1.079	1.119
	27H	2.91	2.57	2.81	2.89	2.72		24	1.132	1	1.093	1.125	1.058
não-normalizado							normalizado						

7.4 Anexo IV

Tabela 7.11 – Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com menor quantidade de tubulina visível. Colônias (A), (C) e (D) da transformação 1.

	DIC	Ph-TRITC: Actina polimerizada		Ph-TRITC: Actina polarizada		Ph-TRITC: Cabos de actina		Ph-TRITC: Patches de actina		GFP: Tubulina	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A	Não tratado	502	86%	306	61%	215	43%	423	84%	134	27%
	DMSO	660	83%	275	42%	293	44%	257	39%	277	42%
	VX-661	599	93%	283	47%	303	51%	252	42%	241	40%
	VX-770	824	88%	328	40%	335	41%	393	48%	370	45%
	VX-809	890	87%	282	32%	281	32%	492	55%	413	46%
C	Não tratado	690	89%	288	42%	358	52%	253	37%	309	45%
	DMSO	632	84%	247	39%	339	54%	189	30%	339	54%
	VX-661	799	94%	111	14%	190	24%	559	70%	202	25%
	VX-770	830	98%	185	22%	331	40%	482	58%	375	45%
	VX-809	1160	95%	291	25%	519	45%	588	51%	511	44%
D	Não tratado	925	64%	216	23%	320	35%	273	30%	505	55%
	DMSO	758	76%	207	27%	287	38%	288	38%	411	54%
	VX-661	629	71%	163	26%	289	46%	155	25%	406	65%
	VX-770	644	76%	153	24%	177	27%	314	49%	487	76%
	VX-809	504	80%	116	23%	171	34%	232	46%	315	63%

Tabela 7.12 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com menor quantidade de tubulina visível. Colônia (H) da transformação 4.

	DIC	Ph-TRITC: Actina polimerizada		Ph-TRITC: Actina polarizada		Ph-TRITC: Cabos de actina		Ph-TRITC: Patches de actina		GFP: Tubulina	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
H	Não tratado	1061	93%	511	48%	705	66%	286	27%	991	93%
	DMSO	1458	96%	699	48%	1043	72%	682	47%	1397	96%
	VX-661	1271	94%	633	50%	871	69%	320	25%	1062	84%
	VX-770	1006	92%	444	44%	551	55%	374	37%	925	92%
	VX-809	1415	97%	609	43%	786	56%	581	41%	1134	80%

Tabela 7.13 - Contabilização das estruturas do citoesqueleto (actina-F e tubulina), em microscopia de fluorescência, em células com menor quantidade de tubulina visível. Colônias (**K**) e (**L**) da transformação 5.

	DIC	Ph-TRITC: Actina polimerizada		Ph-TRITC: Actina polarizada		Ph-TRITC: Cabos de actina		Ph-TRITC: <i>Patches</i> de actina		GFP: Tubulina		
		n	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
K	Não tratado	1054	1024	97	470	45	581	55	443	42	262	25
	DMSO	1579	1514	96	728	46	781	49	733	46	243	15
	VX-661	1529	1492	98	629	41	706	46	786	51	309	20
	VX-770	1698	1649	97	674	40	791	47	858	51	301	18
	VX-809	1509	1437	95	429	28	360	24	1077	71	307	20
L	Não tratado	1113	1034	93	347	31	375	34	659	59	576	52
	DMSO	1010	898	89	335	33	334	33	564	56	585	58
	VX-661	1080	1036	96	415	38	488	45	548	51	586	54
	VX-770	1680	1582	94	600	36	613	36	969	58	918	55
	VX-809	1229	1155	94	352	29	339	28	816	66	638	52